

03065
2



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México.



CARACTERIZACION DE PROTEINAS DE LA
LEVADURA MARINA *Debaryomyces hansenii*,
EN CONDICIONES DE ESTRES SALINO Y
OSMOTICO.

TESIS

que para obtener el grado académico de

Maestra en Ciencias *del Mar*
(Oceanografía Química)

presenta

CLAUDIA MARISSA CALDERON TORRES.

Director de tesis: DRA. PATRICIA THOME ORTIZ.
Comite Tutorial: DR. ANTONIO PEÑA DIAZ,
DR. EDGAR HEIMER DE LA COTERA,
DR. ROBERTO IGLESIAS PRIETO,
C. a DR. JORGE RAMIREZ SALCEDO.

Puerto Morelos., 2000

284533



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS.

Esta tesis se realizó gracias a la beca crédito No. 113999 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de la Unidad Académica de Puerto Morelos del ICMYL a cargo de la Dra. Patricia Thomé Ortiz y del Dr. Roberto Iglesias Prieto, en el laboratorio de Biología Molecular del IFC a cargo del Dr. Antonio Peña Díaz y en el Departamento de Bioquímica, laboratorio No. 4 del IQ a cargo del Dr. Roberto Arreguín.

Agradezco de forma especial a la Dra. Patricia E. Thomé Ortiz su participación en la elaboración, corrección y revisión de esta tesis y sobre todo su amistad.

Al Dr. Antonio Peña Díaz y a sus colaboradores todo el apoyo que me brindaron para realizar parte del presente trabajo.

A la Candidata a Dra. Alejandra Hernández Santoyo su ayuda en el manejo del densitómetro y sus valiosas sugerencias para la presentación de este trabajo.

Y a todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron a la realización del trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	II
ABREVIATURAS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VI
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCION.....	3
2. ANTECEDENTES.....	12
3. OBJETIVOS.....	21
4. MATERIAL Y METODOS.....	22
4.1. Condiciones de crecimiento de <i>Debaryomyces hansenii</i>	22
4.2. Tratamientos de un choque salino, térmico y del efecto combinado.....	23
4.2.1. Choque salino.....	23
4.2.2. Choque térmico.....	23
4.2.3. Efecto combinado de choque salino y térmico.....	23
4.3. Protocolo I para la extracción de proteínas en células de <i>D. hansenii</i>	25
4.3.1. Colecta de células.....	25
4.3.2. Lisis celular.....	25
4.3.3. Fraccionamiento de proteínas mediante la precipitación con sulfato de amonio.....	25
4.3.4. Cuantificación de proteínas.....	25
4.3.5. Electroforesis.....	27
4.4. Marcaje radioactivo de proteínas con metionina [³⁵ S].....	27
4.4.1. Choque salino.....	28
4.4.2. Estrés salino constante.....	28
4.5. Tratamientos de un estrés salino u osmótico constantes.....	29
4.5.1. Estrés salino constante.....	29
4.5.2. Estrés osmótico constante.....	29
4.6. Protocolo II para la extracción de proteínas en células de <i>D. hansenii</i>	29
4.6.1. Colecta de células.....	29
4.6.2. Lisis celular.....	29
4.6.3. Cuantificación de proteínas.....	31
4.6.4. Electroforesis.....	31
4.7. Fraccionamiento celular de proteínas por centrifugación.....	32

4.8. Análisis de geles de poliacrilamida por densitometría.....	34
5. RESULTADOS.....	35
6. DISCUSION.....	52
7. CONCLUSIONES.....	62
8. BIBLIOGRAFIA.....	64

ABREVIATURAS.

ATP Adenosintrifosfato.

CuSO₄ Sulfato de cobre.

C₄H₄Na₂O₆ Tartrato de sodio.

EDTA Acido etilendiaminotetraacético.

KCl Cloruro de potasio.

L-metionina [³⁵S] Metionina marcada con el isótopo radioactivo azufre 35.

MES Ácido 2-N-morfolino-etanosulfónico.

Na₂CO₃ Carbonato de sodio.

NaCl Cloruro de sodio.

NaOH Hidróxido de sodio.

PMSF Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

TEA Trietanolamina.

TCA Ácido tricloroacético.

TRIS-Hidroximetil aminometano.

SDS Dodecil sulfato de sodio.

SC Medio mínimo sintético con base nitrogenada, vitaminas y sales inorgánicas, sin histidina, metionina y triptófano.

YPD Medio de cultivo con extracto de levadura, peptona y glucosa.

YPG Medio de cultivo con extracto de levadura, peptona y galactosa.

YPM Medio de cultivo con extracto de levadura, peptona y maltosa.

LISTA DE FIGURAS.

- Figura 1. Esquema del diseño experimental de los tratamientos de choque salino, térmico y del efecto combinado de choque salino y térmico en presencia de glucosa y galactosa.....24
- Figura 2. Diagrama del Protocolo I para la extracción de proteínas en *D. hansenii*.....26
- Figura 3. Diagrama del Protocolo II para la extracción de proteínas en *D. hansenii*.....30
- Figura 4. Diagrama del fraccionamiento celular por centrifugación.....33
- Figura 5. Curvas de crecimiento de *D. hansenii* en diferentes condiciones experimentales de cultivos.....35
- Figura 6. Patrones de bandas de proteína obtenidos mediante electroforesis y analizados por densitometría, en células de *D. hansenii*. Tratamientos del choque salino, térmico y del efecto combinado de choque salino y térmico en presencia de glucosa.....37
- Figura 7. Patrones de bandas de proteína obtenidos mediante electroforesis y analizados por densitometría, en células de *D. hansenii*. Tratamientos del choque salino, térmico y del efecto combinado de choque salino y térmico en presencia de galactosa....39
- Figura 8. Patrones de bandas de proteína obtenidos mediante electroforesis y analizados por densitometría en células de *D. hansenii*. Tratamiento de un choque salino en presencia de glucosa y fraccionamiento de proteínas por precipitación con sulfato de amonio.....41
- Figura 9. Patrones de bandas de proteína obtenidos mediante electroforesis, y analizados por densitometría, en células de *D. hansenii* creciendo en medio SC, y expuestas a choque salino.....42
- Figura 10. Patrones de bandas de proteína obtenidos mediante electroforesis, y analizados por densitometría, en células de *D. hansenii* creciendo en medio YPM, y expuestas a un estrés salino constante.....42
- Figura 11. Patrones de bandas de proteína obtenidos mediante electroforesis y analizados por densitometría, en células de *D. hansenii*, creciendo en medio YPM. Tratamientos de estrés salino constante con Na^+ y K^+ y tratamiento de estrés osmótico constante con sorbitol.....44
- Figura 12. Patrones de bandas de proteína obtenidos mediante electroforesis y analizados por densitometría, en células de *D. hansenii*, creciendo en medio YPM. Fraccionamiento por centrifugación, fracciones del sobrenadante después de centrifugar a 17 000 x g. Tratamientos de estrés salino constante con Na^+ y K^+ y tratamiento de estrés osmótico constante con sorbitol.....46

- Figura 13. Patrones de bandas de proteína obtenidos mediante electroforesis y analizados por densitometría, en células de *D. hansenii*, creciendo en medio YPM. Fraccionamiento por centrifugación, fracciones del precipitado después de centrifugar a 17 000 x g. Tratamientos de estrés salino constante con Na⁺ ó K⁺, y tratamiento de estrés osmótico constante con sorbitol.....48
- Figura 14. Patrones de bandas de proteína obtenidos mediante electroforesis y analizados por densitometría, en células de *D. hansenii*, creciendo en medio YPM. Fraccionamiento por centrifugación, fracciones del sobrenadante después de centrifugar a 34 500 x g. Tratamientos de estrés salino constante con Na⁺ ó K⁺, y tratamiento de estrés osmótico constante con sorbitol.....49
- Figura 15. Patrones de bandas de proteína obtenidos mediante electroforesis y analizados por densitometría, en células de *D. hansenii*, creciendo en medio YPM. Fraccionamiento por centrifugación, fracciones del precipitado después de centrifugar a 34 500 x g. Tratamientos de estrés salino constante con Na⁺ ó K⁺, y tratamiento de estrés osmótico constante con sorbitol.....50

RESUMEN.

La habilidad de osmo-regular protege a los organismos contra fluctuaciones en la osmolaridad del medio exterior. Por medio de ésta habilidad los organismos controlan su volumen celular y la composición de sus fluidos internos. Los trabajos sobre la respuesta de osmo-regulación en la levadura halotolerante *Debaryomyces hansenii*, incluyen la determinación de cambios en los parámetros de crecimiento como: la velocidad específica de crecimiento (μ_{max}), el tiempo de duplicación (t_d), la biomasa, etc., y en el transporte de iones. Los efectos celulares han sido cuantificados por cambios en la velocidad de respiración y fermentación, en el valor de pH interno y externo, en la concentración de ATP, en la acumulación de compuestos compatibles como el glicerol y por medio de la determinación de proteínas asociadas a la respuesta de osmo-regulación. El presente trabajo evalúa los efectos de estrés salino, térmico y osmótico en la levadura halotolerante *D. hansenii* (cepa Y7426), a través de los cambios en la expresión de proteínas empleando la electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de una dimensión y el análisis de densitometría. Mediante varios experimentos se determinaron los valores de μ_{max} y t_d , así como: las condiciones de los tratamientos de choque salino, térmico y de un estrés salino u osmótico constantes; de la extracción de proteínas y de un fraccionamiento celular de las proteínas que potencialmente varían en respuesta a un cambio salino u osmótico. Las condiciones de los tratamientos incluyeron la exposición de *D. hansenii* a un choque salino en el medio YPD y YPD con NaCl 1 M, a un choque térmico a 35 °C por 45 minutos, a un efecto combinado del choque salino y térmico, y a un estrés salino u osmótico constantes en el medio YPM y YPM con NaCl, KCl o sorbitol 2 M respectivamente. En todas las condiciones de estrés salino se observó el aumento de dos bandas de proteína de 39 y 40 kDa; asociadas a la membrana plasmática, que pueden ser consideradas como proteínas de respuesta específica al estrés salino. En presencia del choque térmico aumentó específicamente la expresión de una banda de 78 kDa, que se considera como una respuesta exclusiva a un choque térmico. En presencia del choque salino o térmico y del estrés salino constante, se observó el aumento en la expresión de dos bandas de proteína de 54 y 55 kDa, asociadas a la fracción de proteínas del citoplasma; éstas pueden ser consideradas como proteínas de respuesta general al estrés salino y térmico. En las condiciones de estrés salino y osmótico constantes se observó el aumento de dos bandas de 72 y 73 kDa, asociadas a las proteínas de las mitocondrias, éstas se consideran como proteínas de respuesta general al estrés osmótico. Sólo en presencia de estrés salino constante con K^+ y Na^+ , aumentaron dos bandas de 85 y 93 kDa respectivamente, ambas se encontraron en la fracción de proteínas del citoplasma y podrían ser consideradas como proteínas de respuesta específica al estrés iónico. En presencia de sorbitol aumentó una banda de 119 kDa, que fue enriquecida en la fracción de las proteínas de las mitocondrias muy probablemente es una proteína de respuesta específica al estrés osmótico. En presencia de choque y de estrés salino y de estrés osmótico aumentaron dos bandas de 46 y 47 kDa, encontradas en la fracción de las proteínas de la membrana plasmática, éstas podrían estar asociadas a sistemas de transporte de iones o compuestos orgánicos en condiciones de estrés osmótico general. En lo relativo a la disminución en la expresión de las bandas de proteína en el tratamiento con choque térmico se observó la disminución de una banda de proteína de 57 kDa, que podría ser considerada como una proteína termo-responsiva. En los tratamientos de estrés salino u osmótico constante disminuyó la expresión de dos bandas de proteína de 109 y 110 kDa,

asociadas a la fracción de las proteínas de las mitocondrias, ésta disminución se considera como una respuesta general a cualquier tipo de estrés osmótico. En presencia del estrés salino y osmótico aumentó la expresión de dos bandas de proteína de 66 y 67 kDa, asociadas a la membrana plasmática y al citoplasma, respectivamente. Estas proteínas podrían tener un papel específico en condiciones de un estrés salino y osmótico. En los tratamientos del choque salino y de estrés salino u osmótico constantes disminuyó la expresión de dos bandas de proteína de 43 y 81 kDa, lo cual sugiere una respuesta general a diversas condiciones de estrés osmótico. Las bandas de 112, 114 y 117 kDa que disminuyeron en presencia de estrés salino u osmótico constantes, en la fracción de proteínas del citoplasma podrían ser enzimas que participan en el metabolismo de la glucosa. La levadura halotolerante *D. hansenii* tiene una respuesta específica para cada tipo de estrés; el grupo de proteínas que responden a la variación de salinidad es diferente al grupo que se expresa al cambio térmico u osmótico no salino.

1. INTRODUCCION.

La osmo-regulación en el medio marino. En cualquier sistema natural, la variación de los factores ambientales rige la distribución espacio-temporal de los organismos. En este contexto, el agua de mar oceánica es un medio que presenta variaciones moderadas. Sin embargo, el agua marina en las zonas costeras presenta fluctuaciones de salinidad, contenido de oxígeno, carbonatos, elementos traza y otros, como consecuencia de procesos de evaporación y el aporte de agua dulce continental. Una de las adaptaciones fisiológicas que presentan los organismos que viven en estas zonas es la osmo-regulación, que se define como la habilidad de las células para ajustar su contenido intracelular de solutos cuando se presenta una variación externa en la concentración de los solutos del medio (Csonka, 1989; Blomberg y Adler, 1992).

El agua de mar caracterizada por la presencia de sales, tiene una composición química en la que sobresalen los iones de Na^+ y Cl^- , que representan el 85 por ciento en peso de la salinidad del agua de mar. La presencia elevada de estos dos iones es tóxica para cualquier organismo si se considera que en el caso del sodio el margen promedio de valores fisiológicos es de 50 a 150 mM (Serrano, 1996). La diferencia entre la concentración de sodio interna y la del medio provocaría una salida masiva de agua de la célula, que podría llegar a la plasmólisis. Sin embargo, los organismos marinos han logrado adaptarse a la salinidad del agua de mar. En algunos ambientes marinos también pueden ocurrir variaciones extremas, lo que limita aún más la distribución espacio temporal de los organismos, siendo pocos los que logran persistir en estos ambientes. Es precisamente en éstos ambientes donde la presencia de organismos despierta el interés en el estudio de la osmo-regulación, ya que la concentración elevada de NaCl ambiental es el factor fisicoquímico que selecciona competidores exitosos.

La osmo-regulación juega un papel muy importante en el ciclo de vida de muchos organismos marinos. Por ejemplo el cangrejo azul *Callinectes sapidus*, que se mueve desde el mar hasta un medio esencialmente de agua dulce, debe mantener las concentraciones de iones en su sangre (hemolinfa) y la osmolaridad constantes (organismo osmo-regulador) y evitar una entrada o salida masiva de agua y solutos. Por el contrario, algunas especies de esturiones que viven en agua dulce y que ocasionalmente migran hacia agua salobre para alimentarse, no tienen mecanismos de osmo-regulación que les permitan mantener la

osmolaridad de su sangre constante durante el cambio de salinidad (organismo osmoconformador) (Krayushkina, 1998). Mientras que en medios con variaciones extremas de salinidad como el ártico, los organismos que ahí sobreviven deben osmo-regular la concentración de solutos internos para tolerar la deshidratación (la disminución de temperatura favorece la formación de hielo. La formación de hielo produce un aumento en la concentración de sales del agua de mar sin congelar y para evitar la salida de agua intracelular, los organismos aumentan la concentración de solutos internos), la salinidad elevada y las temperaturas bajas.

Las algas marinas no realizan migraciones entre ambientes de diferente salinidad pero pueden estar expuestas a variaciones de salinidad, como sucede en las pozas de inter-marea, donde el flujo y reflujo del agua de mar debido al efecto de la marea producen zonas de inundación y desecación cíclicas. En este tipo de ambientes la osmo-regulación tiene un papel importante en la sobrevivencia de las algas marinas; por ejemplo, *Ulva lactuca* mantiene su contenido iónico casi constante durante las fluctuaciones de salinidad producto del efecto de la marea y *Porphyra umbicalis*, detiene su crecimiento para mantener un ajuste osmótico en condiciones de salinidad elevada (Kirst, 1990). Por otra parte, en las lagunas marinas, salinas y el Mar Muerto, representativas de condiciones extremas de salinidad, algas como *Dunalliella salina* mantienen un equilibrio osmótico en estas condiciones gracias a la acumulación de glicerol (Avron, 1986).

En el transcurso de la evolución, cuando los organismos marinos colonizaron los hábitats de agua dulce, uno de los principales problemas a los que se enfrentaron fue el cambio de salinidad, que resolvieron mediante adaptaciones fisiológicas como la osmo-regulación, que les permitió vivir en agua dulce y en tierra. La colonización exitosa de las aguas dulces involucró un cambio gradual a cutículas menos permeables y la restricción de membranas semipermeables; los órganos de excreción adquirieron la capacidad de formar orina y aparecieron células especializadas en concentrar los iones en un medio hiposmótico. Las adaptaciones para sobrevivir en tierra incluyeron cubiertas corporales que previenen la pérdida de agua, escamas en los reptiles, las plumas de las aves y el pelo de los mamíferos que también aíslan y atrapan la humedad. Por el contrario, cuando algunos organismos terrestres regresaron al mar, el cambio de ambiente hizo necesarias adaptaciones osmóticas para sobrevivir en ese medio. En la transición de los cetáceos

(ballenas, delfines, marsopas) durante el Eoceno medio, los mamíferos de tierra de cuatro patas pasaron a ser nadadores obligados (Thewissen *et al.*, 1996). Otro ejemplo es el de los ancestros de los peces óseos que vivieron en agua dulce por casi 250 millones de años antes de regresar al mar durante el período Jurásico y cuyo posible reflejo es la sangre hiposmótica de los peces óseos marinos actuales (Fyhn *et al.*, 1999). Entre las adaptaciones de los actuales peces óseos o verdaderos, está su capacidad para eliminar agua constantemente mediante ósmosis. Ellos toman grandes cantidades de agua de mar eliminando el exceso de sales en la sangre por medio de bombas de sodio, un sistema de exclusión de iones de cloro presentes en las agallas y a través de pequeñas cantidades de orina (Warne, 1998).

La osmo-regulación en el ámbito celular. El conocimiento de funciones tan importantes como la osmo-regulación, debe estudiarse a nivel celular ya que, es en las células donde ocurren los intercambios de solutos que permiten esta regulación. En este sentido, los microorganismos son un modelo de lo que ocurre a nivel celular, además de tener la ventaja de ser fáciles de cultivar y mantener en condiciones controladas. También es conocido el amplio margen de tolerancia a factores ambientales de bacterias, micro-algas y levaduras.

En el estudio de la osmo-regulación no sólo es importante indagar cómo es que la célula ajusta la concentración interna de solutos; también hay que considerar el tipo y la concentración en que se encuentran éstos en el medio. En relación con la concentración, hay organismos tolerantes a medios hiper o hipo-osmóticos. En la tolerancia al tipo de soluto se ha puesto especial interés en definir y entender los mecanismos que intervienen en la halotolerancia, que puede ser definida como la capacidad que ha desarrollado la célula para osmorregular y llevar a cabo sus funciones en presencia de sal (Serrano, 1996).

Implicaciones del proceso de difusión y de la ósmosis en el transporte celular. Todos los organismos llevan a cabo intercambios de gases, agua, minerales, alimentos y la eliminación de desechos. Esto ocurre en el medio celular y requiere que las moléculas se muevan a través de la membrana que rodea a la célula. Hay dos formas en las que las moléculas o partículas se mueven a través de la membrana: el transporte pasivo y activo; el transporte activo requiere que la célula consuma energía para mover moléculas o partículas

a través de la membrana celular. El transporte pasivo no requiere un gasto energético y ocurre espontáneamente. El principio del transporte pasivo es la difusión, que ocurre cuando un sistema no está en equilibrio, y tiene una concentración diferente de moléculas, entonces ocurre el movimiento de moléculas desde una región con una concentración elevada hasta una región de menor concentración; este movimiento es continuo hasta que el sistema alcanza un equilibrio, es decir, una misma concentración en cualquier región del sistema.

La ósmosis es un caso especial de difusión; en este caso también hay una diferencia en la concentración de moléculas y el sistema está dividido por una membrana semipermeable. Dado que las moléculas en la región de mayor concentración no pueden pasar a través de la membrana, el agua tiende a fluir desde la región menos concentrada hacia la región de mayor concentración, haciendo que esta última gane agua y logre un nuevo equilibrio. Este estado de equilibrio impide la entrada de más agua; es decir, ejerce una presión, conocida como presión osmótica (Harold, 1986).

Las condiciones de hipo e hiper-osmolaridad y la osmo-regulación. Hipotéticamente en condiciones hipo-osmóticas, como en el caso de los sistemas de agua dulce, el agua del medio exterior se movería al interior de la célula, mientras que en condiciones hiper-osmóticas, la célula perdería rápidamente agua. En la realidad la célula debe mantener su medio interno en contra de gradientes químicos y eléctricos para evitar flujos de agua así como de solutos dentro o fuera de la célula, para lo cual ha implementado estrategias con el fin de mover solutos en contra de gradientes electroquímicos y/o de concentración.

Por ejemplo, en las bacterias, levaduras y plantas, la presencia de una pared celular, restringe el aumento del volumen. La célula mantiene una concentración de solutos mayor en el citoplasma que en el exterior; esta diferencia también genera presión, conocida como turgencia. Para que la entrada de agua hacia el citoplasma se favorezca, el valor de la presión de turgencia debe ser positivo. Las células animales carentes de una pared celular regulan la inestabilidad osmótica a través de un sistema de intercambio de iones y solutos con el medio, mediante ATPasas de sodio-potasio que transportan potasio hacia el interior al mismo tiempo que sacan al sodio (Serrano, 1996), este intercambio genera un gradiente electroquímico que favorece el transporte secundario de solutos o compuestos orgánicos.

Cambios de la osmolaridad del medio y sus efectos en los procesos celulares. Las alteraciones observadas por un aumento en la concentración de solutos pueden ser: deshidratación celular, modificación parcial o completa de la razón de crecimiento, alteración en la captación de nutrientes y en la síntesis de proteínas (Mager y Varela, 1993), así como reducción en la fotosíntesis y respiración en las algas (Yancey, 1994; Serrano, 1996). En particular, la salinidad tiene dos efectos tóxicos posibles en las células, uno osmótico y otro que está dado por la toxicidad específica de los iones sobre sistemas celulares definidos. Como respuesta los organismos han desarrollado estrategias de defensa como el ajuste osmótico interno, sistemas de transporte de iones y proteínas específicas de respuesta a estrés (Serrano, 1996). Las principales adaptaciones fisiológicas de *S. cerevisiae* sometida a estrés por NaCl son la exclusión molecular de los iones de sodio y cloro así como la acumulación intracelular de compuestos compatibles (Blomberg, 1997).

Respuesta celular a los cambios en la osmolaridad del medio. En la exclusión de solutos son clave los canales iónicos, los transportadores y acarreadores de iones o protones, todos localizados en la membrana plasmática. Las bacterias como *Escherichia coli* cuentan con dos intercambiadores de Na^+/H^+ codificados por los genes *NhaA* y *NhaB*, que son esenciales en la halotolerancia (Serrano, 1996). *Saccharomyces cerevisiae* tiene a pH alcalino una ATPasa del tipo P que bombea sodio al exterior; esta ATPasa de sodio es codificada por el gen *ENA1*, inducible por estrés osmótico, falta de nutrientes y pH elevado (Haro *et al.*, 1991; Garciadeblas *et al.*, 1993). En *Neurospora crassa* se ha reportado la presencia de un intercambiador de Na^+/H^+ en la membrana plasmática; este acarreador lleva a cabo la expulsión de sodio en condiciones hiper-osmóticas (Rodríguez-Navarro *et al.*, 1986). Las vacuolas de las plantas superiores, algas, levaduras y hongos también son importantes en la regulación de la presión de turgencia y en el contenido iónico del citoplasma. La presencia de vacuolas ofrece a estos organismos la posibilidad de segregar iones dentro de organelos, y con ello disminuir su concentración en el citoplasma (Blomberg y Adler, 1992).

Entre los mecanismos celulares que contribuyen a contrarrestar los efectos de una concentración elevada de sales, otra alternativa es la acumulación de cationes, sólo que ésta se encuentra limitada a una concentración máxima que la célula puede acumular sin llegar a

efectos tóxicos. En las enterobacterias, el potasio intracelular sirve como osmolito en el mantenimiento de turgencia positiva (Csonka, 1989). Por ejemplo, *E. coli* presenta dos sistemas de transporte de K^+ hacia el interior: el sistema Trk con afinidad moderada por el K^+ y el sistema Kdp que se induce en presencia de concentraciones bajas de K^+ ($K_m = 2 \mu M$) este sistema probablemente corresponde a una ATPasa (Rosen, 1987). De ahí que la acumulación intracelular de moléculas con pocos efectos dañinos a la maquinaria metabólica celular como los compuestos compatibles u osmolitos, es necesaria para contrarrestar las variaciones de la osmolaridad externa (Yancey *et al.*, 1982; Csonka, 1989; Blomberg y Adler, 1992; Blomberg, 1997). Con la acumulación de estos compuestos, las células disminuyen su potencial osmótico citosólico además de ganar agua y turgencia. La estrategia celular de utilizar compuestos compatibles que permite a las proteínas funcionar en presencia de concentraciones de solutos de estrés elevadas o variables, sin llegar a la modificación de un gran número de enzimas, reduce el gasto energético celular, ya que requieren de un menor número de cambios genéticos para adaptarse a las variaciones de osmolaridad en el medio (Yancey *et al.*, 1982).

Se han identificado osmolitos en diferentes organismos; por ejemplo, la presencia de aminoácidos en invertebrados marinos, poli-alcoholes en las levaduras y algas marinas, prolina y glicina en las plantas. La acumulación por síntesis y/o transporte de estos compuestos orgánicos a partir de las rutas metabólicas existentes se presenta en las bacterias, plantas y animales. Estos compuestos orgánicos son compatibles con la estructura de las membranas y proteínas, es decir son inocuos a la estructura y función de las proteínas, además de permitir la hidratación preferente de las proteínas y la exclusión de los iones que podrían interactuar con los grupos químicos específicos de las proteínas (Yancey *et al.*, 1982; Wiggins, 1990; Blomberg y Adler, 1992; Santoro *et al.*, 1992; Serrano, 1996). Hay cuatro clases principales de osmolitos: aminoácidos libres y sus derivados (glutamato, prolina, betaína y metilaminas), azúcares no reductores (sacarosa y trehalosa), polialcoholes (glicerol, sorbitol, arabitol y manitol) y urea (Yancey *et al.*, 1982). Los azúcares y los polialcoholes tienen la propiedad de estabilizar la estructura macromolecular bajo condiciones extremas como choque térmico y salino (Yancey, 1994).

Aspectos importantes en los estudios de osmo-regulación. Los estudios de osmo-regulación abarcan diferentes aspectos; entre ellos la elección del sistema biológico para realizar ensayos de estrés osmótico, que idealmente debería incluir organismos con una osmo-regulación y/o halotolerancia elevadas, el tipo y concentración del soluto con el que se va a estresar a la célula y los efectos celulares después de exponer a las células a estrés osmótico. Los efectos celulares pueden ser monitoreados a través de estudios bioquímicos: cambios de la actividad enzimática de proteínas de vías metabólicas, cambios en la velocidad de respiración, variación del valor del pH celular y del medio, cambios en la concentración de metabolitos, cambios en la expresión de las proteínas, modificación de las vías de señalización para la inducción y regulación de la transcripción de genes, regulación de la síntesis de proteínas, determinación del transporte de iones, cambios en el volumen celular, concentración interna de los iones y la fijación y/o biosíntesis de osmolitos.

Características de los sistemas biológicos en el estudio de la osmo-regulación. *S. cerevisiae*, es una levadura con halotolerancia moderada. Debido a la gran información fisiológica y genética que se tiene en esta especie, ha sido utilizada como uno de los principales modelos en estudios de osmo-regulación y halotolerancia (Prista *et al.*, 1997). Sin embargo, las levaduras con halotolerancia elevada como: *Pichia sorbitophila*, *Zigosaccharomyces rouxii*, *Zigosaccharomyces pombe*, *Debaryomyces hansenii*, ofrecerían una mayor ventaja en el estudio de la osmo-regulación a nivel celular, por su alta resistencia a concentraciones elevadas de sales.

Debaryomyces hansenii es una levadura que presenta tolerancia a concentraciones elevadas de sales (Norkrans y Kylin, 1969; Adler *et al.*, 1985; Lucas *et al.*, 1990; Larsson *et al.*, 1990; Hernández-Saavedra *et al.*, 1995; Gupta, 1996). Los mecanismos de respuesta a un medio hiperosmótico propuestos para esta levadura son principalmente: *i*) expulsión del sodio y concentración de potasio (Norkrans y Kylin, 1969; Prista *et al.*, 1997) a través de un sistema de difusión facilitada (Thomé-Ortiz *et al.*, 1998), *ii*) acumulación de sodio, sin efectos aparentes de toxicidad (Prista *et al.*, 1997; Neves, Oliveira y Lucas, 1997; Thomé-Ortiz *et al.*, 1998), y *iii*) La acumulación o producción de glicerol sintetizado a partir de glucosa (Adler *et al.*, 1985; Nilsson y Adler 1990).

Los estudios comparativos de osmo-regulación y halotolerancia entre *D. hansenii* y *S.*

cerevisiae indican que la segunda no es tolerante a concentraciones elevadas de Na^+ en el medio (Norkrans y Kylin, 1969; Prista *et al.*, 1997). Cuando el pH del medio de cultivo es de 8, el crecimiento de *S. cerevisiae* se inhibe, mientras que en *D. hansenii*, el crecimiento, la concentración de células y la biomasa sólo presentan ligeras variaciones (Hobot y Jennings, 1981; Burke y Jennings, 1990). Esto sugiere que *D. hansenii* es tolerante a concentraciones elevadas de Na^+ y a pH alcalino condiciones similares a el agua de mar. La producción de glicerol en *D. hansenii* en presencia de NaCl 1.4 M no muestra aumentos significativos de las enzimas glicerol fosfato deshidrogenasa (GDP) y glicerol-3-fosfatasa (G3P), y sólo se observa un incremento duplicado de la actividad de la enzima GDP y de la enzima G3P. Si se incubaba a *S. cerevisiae* en condiciones similares, se observa un aumento de siete veces para GDP y cinco veces para G3P (revisado por Blomberg y Adler, 1992; Thomé y Trench, 1999); ésto indicaría que *D. hansenii* tiene una tolerancia al sodio eficiente con un gasto energético menor al de *S. cerevisiae*.

Utilización de la levadura halotolerante *Debaryomyces hansenii* en el estudio de la osmo-regulación. Las consideraciones anteriores, sitúan a *D. hansenii*, como un sistema ideal para el estudio de la osmo-regulación y la halotolerancia. La mayoría de los trabajos realizados con esta levadura han intentado determinar aspectos de su fisiología en condiciones de estrés osmótico. En relación con el crecimiento se ha determinado su velocidad específica, el tiempo de duplicación y la duración de cada una de las fases de crecimiento (Norkrans, 1966, 1968; Burke y Jennings, 1990; Larsson y Gustafsson, 1993). En lo que concierne al transporte de iones, se ha determinado la cinética de acumulación de cationes monovalentes (Na^+ , K^+ , Rb^+ , Li^+) y la velocidad de acumulación de K^+ (Neves *et al.*, 1997; Prista *et al.*, 1997; Thomé-Ortiz *et al.*, 1998). Sobre los efectos celulares se ha evaluado la posible variación de la velocidad de respiración y fermentación, el valor de pH interno y externo, así como la concentración de ATP (Norkrans y Kylin, 1969, Hobot y Jennings, 1981; Thomé-Ortiz *et al.*, 1998). Y como respuesta para mantener el equilibrio osmótico se ha determinado la acumulación de osmolitos como el glicerol (Gustafsson y Norkrans, 1976; Adler *et al.*, 1985; André *et al.*, 1988; Larsson *et al.*, 1990). A nivel molecular, han sido muy pocos los trabajos realizados, Thomé-Ortiz (1995) encontró que *D. hansenii* sometida a estrés salino, sintetizaba *de novo* al menos cuatro proteínas con un

peso molecular de 36, 42, 60 y 170 kDa; una de ellas coincide con la enzima GPD, al igual que en *S. cerevisiae*, y es inducida a nivel de la transcripción del ARNm (Thomé y Trench, 1999). En otros trabajos se han identificado plásmidos presentes en condiciones de salinidad elevada (Gunge *et al.*, 1993; Fukuda *et al.*, 1997). En un trabajo reciente, Bansal y Mondal (2000) aislaron y secuenciaron un gen homólogo al gen *HOG1* de *S. cerevisiae*; en esta levadura, *HOG1* codifica una proteína MAP cinasa que participa en la cascada de señales de respuesta a la hiperosmolaridad.

La información antes mencionada es insuficiente para proponer un modelo que explique los mecanismos de osmo-regulación y halotolerancia en *D. hansenii*, se requieren trabajos enfocados al estudio de genes que respondan directa e indirectamente al estrés salino y osmótico para saber cómo están regulados, cuáles son las vías de señalización que los activan, para qué proteínas codifican y cual es su papel en la osmo-regulación. Otro enfoque podría ser el estudio de los cambios en los patrones proteínas en respuesta al estrés osmótico. Blomberg (1997) indica que el análisis de proteínas es una buena herramienta en el conocimiento de la fisiología a nivel molecular de células expuestas a condiciones de estrés osmótico. En este trabajo se realizó la caracterización de los cambios en la expresión de proteínas en *D. hansenii* en condiciones de estrés salino u osmótico por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de una dimensión.

2. ANTECEDENTES.

Entre los trabajos pioneros sobre *D. hansenii* se encuentran los trabajos de Norkrans (1966; 1968) y Norkrans y Kylin (1969) que se enfocaron a determinar si algunas levaduras presentes en el mar podrían ser consideradas como marinas. Para ello evaluaron parámetros de crecimiento, respiración, fermentación, concentración celular y cinética de acumulación de Na^+ y K^+ , en condiciones de salinidad, pH y temperatura similares a las del agua de mar. Por lo que respecta a *D. Hansenii*, encontraron que podía crecer a concentraciones de NaCl de 4.1 M, pH de 8.5 y temperatura de 6 °C, como control se observó que en comparación con *S. cerevisiae* fue incapaz de crecer bajo estas condiciones. Con esta información se sugirió que *D. hansenii* es una levadura marina halotolerante. El trabajo sobre la actividad respiratoria y de fermentación confirmó que *D. hansenii* es una levadura halotolerante, ya que fue capaz de presentar actividad respiratoria y de fermentación en presencia de NaCl 4.1 M. Cuando estos autores midieron la velocidad de acumulación de potasio en presencia de NaCl 4 mM, 0.68, 1.35 y 2.7 M, observaron que la acumulación de potasio era mayor al aumentar la concentración de sodio en el medio hasta una concentración de NaCl 1.3 M en ambas levaduras, y en presencia de NaCl 2.7 M la acumulación de potasio fue mayor en *D. hansenii* que en *S. cerevisiae*. Por lo que respecta a la velocidad de acumulación de sodio, encontraron que al añadirlo en un margen de concentraciones de 4 mM a 2.7 M, *D. hansenii* lo incorpora rápidamente en los primeros 30 minutos; con esto se estableció que la concentración mayor de sodio celular dependía del aumento de la concentración en el medio. Sin embargo en los siguientes 60-120 minutos presentaba una pérdida masiva de sodio que no tuvo cambios significativos después de 20 horas. Con esta información postularon que la mayor habilidad de *D. hansenii* para acumular K^+ en presencia de Na^+ comparada a la de *S. cerevisiae* era uno de los principales mecanismos para explicar su mayor tolerancia a la salinidad.

En trabajos posteriores se identificó el papel de los osmolitos o compuestos compatibles en la osmo-regulación. Gustafsson y Norkrans (1976) encontraron que *D. hansenii*, al igual que otros organismos halotolerantes, producía glicerol, y que la concentración interna de glicerol aumentaba al aumentar la salinidad del medio de cultivo. Los autores indicaron que esta levadura podía mantener su actividad metabólica en presencia de concentraciones

elevadas de sodio gracias a la producción de glicerol, que actuaba como soluto compatible. Larsson *et al.* (1990) encontraron que la concentración intracelular de glicerol podía llegar a ser casi de 10^4 veces mayor que la concentración en el medio.

Son trabajos como el de Hobot y Jennings (1981) los que dieron continuación a la búsqueda de los mecanismos implicados en la halotolerancia de esta levadura. Estos autores intentaron explicar la respuesta diferente de crecimiento de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* en medios de pH alcalino y salinidad elevada, observada en el trabajo de Norkrans (1966) e indicaron que la diferencia se debía probablemente a la existencia de un transportador o bomba de sodio, presente sólo en *D. hansenii*.

Tiempo después, Haro *et al.* (1991) determinaron en *S. cerevisiae* la presencia de un gen denominado *ENAI* cuyo producto era la ATPasa de Na^+ , que bombea estos cationes al medio, activa a pH alcalino. Aunado a lo anterior se sugirió la existencia de otro sistema de transporte, siendo probable la participación de intercambiadores H^+ /catión.

En un trabajo dedicado a determinar la regulación metabólica de la producción de glicerol, Adler *et al.* (1985) generaron y aislaron mutantes incapaces de crecer en un medio de salinidad elevada y en presencia de glicerol. Determinaron que la producción de glicerol en *D. hansenii* en condiciones de estrés salino era el resultado de la síntesis a partir de glucosa, vía la oxidación de la dihidroxiacetona fosfato, reacción que es catalizada por la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, NAD-específica. En estudios similares se determinó que esta misma vía de síntesis de glicerol funcionaba en *S. cerevisiae* y *Zygosaccharomyces rouxii*. (Blomberg y Adler, 1992).

En otro trabajo sobre la cinética de producción y acumulación celular de glicerol, André *et al.* (1988) encontraron que al transferir células de *D. hansenii* de un medio sin sales a un medio de salinidad elevada, la producción y la acumulación intracelular de glicerol aumentaba proporcionalmente al aumento de la salinidad. Las células, creciendo en un medio de salinidad elevada perdían rápidamente glicerol al ser transferidas a un medio de menor salinidad. Ya que no se encontró una concentración mínima de NaCl a partir de la cual se acumulaba glicerol, los autores sugirieron que la acumulación de glicerol era una respuesta a estrés osmótico y no a salinidad por sí misma.

Burke y Jennings (1990) también evaluaron los efectos del NaCl sobre las características de crecimiento de *D. hansenii* en un medio adicionado con NaCl 1.5 M y

pH 8. Estos autores postularon que esta levadura osmo-regulaba por medio de dos mecanismos, uno de corto plazo que involucraba el transporte de sodio al interior, y el segundo la pérdida de sodio de la célula, ambos asociados a la síntesis de glicerol. También sugirieron que en medios de baja salinidad los osmolitos principales eran potasio y glicerol, mientras que en medios de mayor salinidad eran sodio, glicerol y arabinitol. Sus estudios confirmaron que el crecimiento de esta levadura en medio salino es fisiológicamente diferente en condiciones alcalinas o ácidas, con un crecimiento óptimo en condiciones alcalinas.

Hasta ese momento, y con la información disponible sobre la fisiología, bioquímica y biología molecular de diversas levaduras y hongos osmo-tolerantes, Blomberg y Adler (1992) hicieron una revisión, en la cual consideraron diferentes aspectos del proceso de la osmo-regulación. Colocaron en primer lugar las características termodinámicas del agua como solvente, ya en el medio o en las células, bajo condiciones estándar, y qué sucedía en el ámbito celular si cambiaba la concentración de sales, indicando que los efectos se observaban como un cambio del volumen celular o de la presión de turgencia. A este respecto mencionan que la mayoría de los hongos y levaduras aumentan su presión de turgencia como respuesta a valores pequeños del potencial de agua en el medio y *D. hansenii*, por el contrario, disminuye la presión de turgencia. En un intento por explicar la respuesta tan diferente en esta levadura Larsson *et al.* (1990) sugirieron que si esta disminución era una señal de respuesta a cambios en la osmolaridad del medio, muy probablemente aquellas células que crecían en salinidades elevadas externas disminuían la presión de turgencia para asegurar la síntesis continua de glicerol.

En la revisión, se define el término osmo-regulación (ver introducción) enfatizando que este debe ser utilizado sin tomar en cuenta los mecanismos que lo controlan. Por lo que respecta a la acumulación o producción de compuestos compatibles, sugieren que su función a nivel celular es la hidratación preferente y la exclusión del soluto del entorno inmediato de las proteínas.

Blomberg y Adler indican en esta revisión (1992) otros aspectos relacionados a la acumulación y síntesis de compuestos compatibles u osmolitos, como: *i*) el transporte osmolito- específico que deben presentar estos organismos; en particular mencionan como ejemplo que *D. hansenii*, de acuerdo con las evidencias presentadas en el trabajo de Lucas

et al. (1990) probablemente tiene un sistema constitutivo de intercambio de sodio y glicerol asociado a la elevada halotolerancia de esta levadura; *ii*) el cambio y regulación de la ruta metabólica que sintetiza el osmolito, aspecto en el que se debe considerar si el organismo fermenta o respira, y *iii*) cuáles son las características químicas y cómo funciona el osmolito que acumula o produce cada organismo. Al referirse a *D. hansenii*, indicaron que ésta levadura que osmo-regula utilizando Na^+ y glicerol.

Larsson y Gustafsson (1993) evaluaron los efectos de la osmosensibilidad en el crecimiento de *D. hansenii* y *S. cerevisiae*. Las células creciendo en medios de pH ajustado y sin ajustar y fuentes de nitrógeno en forma de amonio o urea, fueron sometidas a deshidratación osmótica en placas de agar o cultivos líquidos, con NaCl 2.1 y 2.7 M. La respuesta de osmosensibilidad fue determinada como la capacidad para formar colonias y la duración de la fase de retardo, respectivamente. Observaron una respuesta de osmosensibilidad inicial mayor en presencia de NaCl 2.7 M para los dos tipos de medio. En cultivos líquidos cuya fuente de nitrógeno cambió de amonio a urea, registraron la mayor duración de la fase de retardo. La respuesta de osmosensibilidad fue muy similar en las dos levaduras, sólo que el nivel umbral fue mayor en *D. Hansenii*. En un medio con pH de 6, la osmosensibilidad de *D. hansenii* disminuía casi por completo al inicio del crecimiento. También observaron que la producción de compuestos compatibles y la concentración de K^+ intracelular no eran afectadas por el cambio en la fuente de nitrógeno. La propuesta más relevante en este trabajo fue que la osmosensibilidad observada en *D. hansenii* dependiente del pH era un factor determinante para entender la osmotolerancia en esta levadura.

En el contexto de estudios recientes relacionados con los mecanismos de respuesta al estrés salino de *D. hansenii*, destacan los trabajos de Neves *et al.* (1997), Prista *et al.* (1997), así como el de Thomé-Ortiz *et al.* (1998) y Thomé y Trench (1999). Neves *et al.* (1997) encontraron que las concentraciones intracelulares de Na^+ y K^+ alcanzan un máximo en presencia de NaCl 1M en el medio; las concentraciones disminuyen cuando aumenta la concentración de NaCl hasta 1.5 M. Estos resultados, aunados a la observación de que la proporción de K^+ y Na^+ intracelular se mantiene constante a pesar de los cambios en la salinidad del medio, les llevaron a proponer que *D. hansenii* tiene un sistema de transporte eficiente capaz de mantener una homeostasis del cociente K^+/Na^+ . Prista *et al.* (1997) encuentran que *D. hansenii* es más tolerante que *S. cerevisiae* al Na^+ y Li^+ . Como la

toxicidad al Na^+ y K^+ fue similar en *D. hansenii*, se sugirió que en esta levadura no hay una toxicidad específica asociada al Na^+ , sólo el efecto osmótico, mientras que en *S. cerevisiae* el sodio sí es tóxico en concentraciones menores a las del K^+ . En medios cuya concentración de K^+ fue menor a la de Na^+ , *D. hansenii* presentó casi las mismas velocidades de crecimiento que en el medio control y acumuló concentraciones de K^+ relativamente elevadas en citoplasma. Estos hechos apoyaron la hipótesis de que el Na^+ no es tóxico para *D. hansenii*. También observaron que la eficiencia para expulsar Na^+ en ambas levaduras es muy similar, y que la simple expulsión del Na^+ no es suficiente para explicar la elevada halotolerancia de *D. hansenii*.

El mecanismo que propusieron para explicar la toxicidad en *S. cerevisiae* fue la inhibición competitiva de la acumulación del K^+ , que lleva a la disminución del K^+ en la célula, y por lo tanto a un aumento en el nivel de sodio. Los autores indicaron que la eficiencia del transportador de *D. hansenii* no es mejor que la del transporte de *S. cerevisiae*, ya que *D. hansenii* pierde más K^+ que *S. cerevisiae* cuando las células crecen en concentraciones de K^+ elevadas, luego de ser resuspendidas en un medio de concentración menor de K^+ . Prista y colaboradores sugirieron que una diferencia importante entre estas levaduras es el efecto del Na^+ sobre el transportador de potasio. Los autores indicaron que aunque *D. hansenii* tenga un mecanismo eficiente para sacar Na^+ y meter K^+ , la diferencia principal entre ambas levaduras es que el sodio intracelular no es tóxico para *D. hansenii*. Sugirieron también que la activación de la acumulación de K^+ por Na^+ aun cuando la concentración de K^+ sea pequeña, le confiere a *D. hansenii* una ventaja competitiva en medios naturales donde el K^+ es escaso y el Na^+ es abundante. Estos autores concluyeron que *D. hansenii*, hasta ese entonces considerada como una levadura de halotolerancia elevada, podría ser considerada halofílica en medios naturales.

Thomé-Ortiz *et al.* (1998) también consideraron que *D. hansenii* no es halotolerante sino halofílica y observaron que los iones de K^+ y Na^+ no son tóxicos para esta levadura, además de mantener concentraciones elevadas de ambos cationes durante el crecimiento. Encontraron que una gran proporción del contenido del catión interno era intercambiada por las células con el catión opuesto. Argumentaron que este intercambio no se debe a los cationes atrapados en el espacio de la pared celular. Las células crecidas en medios con una concentración menor de NaCl o KCl y luego transferidas a medios de concentración

elevada del mismo catión o del catión opuesto, presentaron una acumulación inicial rápida de ambos cationes, seguida por una velocidad menor que los autores no asociaron a un fenómeno pasivo o de intercambio de cationes en la pared celular. Consideraron que *D. hansenii* creciendo en NaCl o KCl 1M, tiene un sistema de difusión que parece ser más específico para Na⁺. Sus resultados demostraron que en *D. hansenii* existen diversos mecanismos de transporte, uno de los cuales es similar al de *S. cerevisiae*, como la ATPasa de protones, que disminuye los valores de ATP en presencia de potasio, facilita el intercambio de protones y también mantiene el potencial de membrana. Después de añadir Na⁺ y K⁺ a pH de 8 observaron un aumento significativo del pH interno (pH_i), que podría ser explicado por la existencia de un intercambiador K⁺/H⁺ para *D. hansenii*. Este tipo de intercambiador ya ha sido demostrado para *S. cerevisiae* (Ramírez *et al.* 1998). El cambio del pH_i fue acorde con la acidificación rápida del medio, que a su vez coincide con una salida rápida de protones, así como con el movimiento de K⁺ al interior de la célula. Otro mecanismo que consideraron factible es un intercambiador muy rápido catión/catión, probablemente con afinidad baja, que podía catalizar el intercambio particularmente a concentraciones elevadas de cationes dentro y fuera de las células. Finalmente plantean que todas estas respuestas muy probablemente implican una regulación genética.

Thomé y Trench (1999) analizaron si el aumento de la enzima GPD-NAD como respuesta a un choque salino se debía a una inducción de síntesis o activación de la enzima. En *S. cerevisiae*, la enzima se detectó en la fase de crecimiento exponencial, con y sin sales, mientras que en *D. hansenii* la enzima sólo se observó en condiciones de choque salino durante la fase de crecimiento exponencial, ya que en la fase estacionaria no se observaron niveles detectables de la enzima. Al evaluar diferentes concentraciones de NaCl sobre la inducción de la GPD-NAD, estos autores observaron un aumento en los niveles de la proteína al aumentar la salinidad del medio hasta una concentración de 3 M de NaCl; los valores mayores de salinidad disminuyeron los niveles de GPD-NAD. En este trabajo también analizaron el ARNm de *D. hansenii*; creciendo en ausencia o presencia de sales; no encontraron ARNm en células sin sal. Las pruebas de hibridación del ARN demostraron un aumento del transcrito ARNm-GPD en NaCl 1.5 M y una disminución en NaCl 2.7 M. Con ello estos autores indicaron que aumento en GPD-NAD y en el transcrito ARNm-GPD era una respuesta al estrés por sal. Al igual que en otros trabajos sus resultados apoyaron el

concepto de que *D. hansenii* no responde a un estrés salino durante la fase de crecimiento estacionaria, y que las células sin estrés salino no expresan la enzima a niveles significativos, por lo que GPD-NAD es responsable directamente de la síntesis de glicerol.

La información sobre *S. cerevisiae* en relación con la osmo-regulación, es mucho mayor que en *D. hansenii*. A pesar de ello todavía se desconoce en detalle los diferentes procesos celulares que participan en el fenómeno de la osmo-regulación. Se ha determinado que las consecuencias directas de los cambios en la osmolaridad incluyen la acumulación de compuestos compatibles y el movimiento de cationes monovalentes a través de la membrana celular. Por lo que respecta a la halotolerancia, se ha propuesto que son los efectos tóxicos del Na^+ específicos para cada organismo los que podrían determinar halotolerancia.

Por lo que respecta a los trabajos realizados sobre la expresión de proteínas en levaduras, la mayoría se han realizado en la levadura *S. cerevisiae*. Varela *et al.* (1992) evaluaron los efectos del choque salino, osmótico y térmico sobre la inducción de síntesis de proteínas en la levadura *S. cerevisiae*; encontraron que *S. cerevisiae* expuesta a un choque salino de una hora (NaCl 0.7 M) presenta un incremento de proteínas con un peso molecular de 73, 63, 45, 35, 33, 29, 26 y 14 kDa, de las cuales sólo las de 26 y 14 kDa, consideraron similares a las proteínas que aumentan con un choque térmico. En el mismo trabajo se evaluó la fijación de metionina [^{35}S] como estimación de la síntesis de proteínas en la respuesta de osmotolerancia en células de *S. cerevisiae* que primero fueron sometidas a un choque térmico a 40°C por 30 minutos y luego a un choque salino (NaCl 1.4M) pero no registraron un aumento considerable en la fijación de metionina [^{35}S]. Con estos resultados, los autores apoyaron la propuesta de Trollmo *et al.* (1988), quienes sugieren que un acondicionamiento previo por choque térmico no induce osmotolerancia en *S. cerevisiae*. Varela y colaboradores también evaluaron el efecto del choque osmótico sobre los cambios en la expresión de proteínas de *S. cerevisiae* expuesta a NaCl 0.7 M o sacarosa 0.8 M; encontraron que solamente en presencia de NaCl 0.7 M hay un aumento en las proteínas de choque térmico de 12 y 26 kDa, por lo que indicaron que es mayor el efecto del Na^+ que el de la sacarosa en un choque osmótico. En los resultados de estos autores se muestra claramente que la expresión de proteínas es diferente para cada tipo de estrés,

aunque se debe tener en cuenta que algunas de las proteínas que se expresan luego de un choque térmico pueden expresarse cuando se aplica un choque salino.

En la levadura *Zygosaccharomyces rouxii*, Yagi y Nishi (1993) reportaron cambios en la expresión de proteínas de esta levadura en la cepa silvestre y una cepa sensible a estrés salino, después de un choque salino con NaCl 1 M por 30 min. Estos autores indicaron el aumento de las siguientes proteínas en ambas cepas: 19, 23, 32, 35, 40, 48 y 70 kDa, así como la disminución de dos proteínas de 61 y 93 kDa y solo en la cepa silvestre sometida a choque salino, el aumento de tres proteínas (121, 123 y 124 kDa). Postulan que sólo las tres proteínas presentes en la cepa silvestre son importantes en la osmo-regulación de *Z. rouxii*.

Blomberg (1995) al medir la incorporación de metionina [³⁵S], como estimación de la síntesis de proteínas en la respuesta de osmotolerancia en células de *S. cerevisiae* durante los primeros 60 minutos después de incubar a esta levadura en medio SC NaCl 0.7 M y analizar los cambios de expresión de proteínas en geles de poliacrilamida de dos dimensiones. Este autor encontró 18 proteínas que aumentaban fuertemente su expresión después de choque salino (22, 25, 27, 29, 33, 34, 41, 44, 49, 50, 52, 61, 62, 63, 71, 72, 105, 106 kDa), de las cuales se conoce la función de al menos dos, Hsp104p (106 kDa) y Gpd1p (41 kDa), señalando que muy probablemente el gen *CTT1* que codifica una proteína de 64 kDa corresponda a alguna de las dos proteínas de 62 y 61 kDa. Este autor señala que las otras proteínas de las cuales se desconoce su función son un potencial en la identificación de genes controlados por salinidad.

Lewis *et al.* (1995) determinaron el efecto de un choque salino o térmico sobre la expresión de proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* y encontraron en un tratamiento por salinidad (NaCl 300 mM) que la inducción de algunas proteínas (53, 63, 69, 71, 87 y 100 kDa) también aumentaba por el choque térmico (a 37° C por 45 min.) (63, 69, 72, 74, 86, 87 y 100 kDa). Los autores indicaron que esta similitud en las bandas de proteína podría implicar una respuesta común al choque salino y térmico, pero que el aumento de dos bandas de proteína (53 y 71 kDa) sólo con choque salino era una respuesta específica de las proteínas en presencia del choque salino.

Hirayama *et al.* (1995), evaluaron la respuesta a la osmolaridad en *S. cerevisiae* expuesta a choque por NaCl 1 M, Sorbitol 1.5 M y estrés térmico a 39 °C por una hora, de siete clones de ADN complementario. Estos autores encontraron por medio del análisis de

Northern blot que cuatro de los clones *HOR1*, *HOR2*, *HOR4* y *HOR6* sólo se presentaban en las condiciones de estrés osmótico de Na⁺ y Sorbitol y que la expresión de los otros tres clones *HOR3*, *HOR5* y *HOR7* se presentaba tanto en el estrés osmótico como en el estrés térmico. *HOR1* codifica a la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Gdp1p), *HOR3* codifica una enzima glucocinasa (Glk1p), *HOR4* a un transportador de hexosas (Hxt1p), *HOR5* a la proteína de choque térmico de 12 kDa y *HOR6* a la ATPasa de Na⁺, K⁺ y Li⁺ (Ena1p). De estas proteínas, se sabe que Gdp1p y Ena1p están involucradas directamente en osmo-regulación, en la síntesis del osmoprotector glicerol y en la exclusión de Na⁺ del citoplasma, respectivamente.

3. OBJETIVO GENERAL.

- Caracterizar la expresión de proteínas en *Debaryomyces hansenii* expuesta a estrés salino u osmótico por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de una dimensión.

Objetivos específicos.

- Elaborar un protocolo de extracción de proteínas en la levadura halofílica *D. hansenii* y determinar las condiciones del estrés osmótico, para obtener proteínas de respuesta específica a estrés salino u osmótico.

- Ensayar diferentes fuentes de carbono y concentración de solutos de estrés (NaCl y KCl).

- Evaluar el efecto de estrés térmico sobre la expresión de proteínas de *D. hansenii* para comparar con las proteínas que cambiaron su expresión en condiciones de estrés salino u osmótico y verificar la ausencia o presencia de proteínas de respuesta general a estrés.

- Determinar diferencias y similitudes en la expresión de proteínas de *D. hansenii* en condiciones de choque salino por medio del marcaje radioactivo de proteínas con metionina [³⁵S].

- Evaluar la respuesta a estrés osmótico empleando Sorbitol y a estrés salino empleando NaCl y KCl.

- Determinar la localización celular de las proteínas cuya expresión se modifique en presencia de estrés osmótico mediante un fraccionamiento de componentes celulares por centrifugación.

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1. Condiciones de crecimiento de *Debaryomyces hansenii*.

Para determinar las condiciones experimentales de crecimiento de la levadura *D. hansenii*, se hicieron curvas de crecimiento utilizando la cepa Y7426 de la levadura halotolerante *D. hansenii*, que proviene de la colección de cepas del Departamento de Agricultura de Peoria Illinois, Estados Unidos. Esta cepa se mantiene en medio rico más glicerol al 15% (v/v) a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Del cultivo en glicerol se sembró una placa con medio YPD [Extracto de levadura (1%), peptona (1%) y glucosa (2%)] con agar (2%), la placa se incubó a $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas en un agitador rotatorio (New Brunswick Scientific) a 250 rpm, con el fin de tener células recientes y asegurar cultivos sin contaminación.

Las fases de crecimiento de las curvas de crecimiento de *D. hansenii* se evaluaron mediante el criterio del aumento en el número de células por mililitro en intervalos regulares de tiempo. El número de células se determinó por medio del conteo directo de tres muestras de cada uno de los cultivos en un hemocitómetro tipo Neubauer. Las curvas de crecimiento se obtuvieron al graficar el \log_{10} del número de células en el eje de las ordenadas y el tiempo en horas en el eje de las abscisas.

Se hicieron precultivos a partir de la placa YPD con agar, es decir de la placa se tomaron colonias para inocular tres matraces Erlenmeyer de 300 ml, uno con 50 ml de medio YPD, otro con 50 ml de medio YPD NaCl 1 M y otro con 50 ml de medio YPD KCl 1 M. Estos precultivos se incubaron a $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación continua, hasta obtener una densidad de $1 \times 10^8\text{ cel ml}^{-1}$ (fase estacionaria de crecimiento).

Los cultivos a partir de los cuales se determinaron los parámetros de crecimiento se iniciaron en la fase de crecimiento exponencial, el margen de valores de la densidad celular para inocular en ésta fase de crecimiento es de 10^5 a 10^6 cel ml^{-1} (Kocková-Kratochvílova, 1990). Para que los cultivos tuvieran una densidad celular inicial de $3 \times 10^6\text{ cel ml}^{-1}$ de cada precultivo se tomaron alícuotas con un número de células conocido, y se inocularon tres matraces Erlenmeyer de 300 ml con 50 ml de los medios YPD, YPD con NaCl 1M y YPD con KCl 1 M. Los cultivos se incubaron a $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación continua, y se realizó un conteo de células cada dos horas.

Los valores de velocidad específica (μ_{max}) y tiempo de duplicación (t_d) se calcularon a partir de las siguientes fórmulas (Fiechter *et al.*, 1987):

$$\mu_{max} = \ln(X/X_0)/t$$

$$t_d = \ln 2 / \mu_{max}$$

Donde: X = número de células al tiempo x .

X_0 = número de células iniciales.

4.2. Tratamientos de un choque salino, térmico y del efecto combinado.

Para evaluar los cambios en la expresión de proteínas en células de *D. hansenii* expuestas a un choque salino ó térmico y de un efecto combinado de choque salino y térmico en presencia de glucosa ó galactosa como fuentes de carbono, se realizaron dos experimentos, en uno se utilizó glucosa y en el otro galactosa ambos incluyeron los tratamientos de un choque salino, un choque térmico y del efecto combinado de ambos (Figura 1).

4.2.1 Choque salino. Los cultivos control se realizaron en los medios YPD ó YPG sin sales. El tratamiento por choque salino consistió en añadir NaCl a una concentración final de 1 M a dos cultivos con los medios YPD ó YPG en la fase de crecimiento exponencial (5×10^7 cel ml⁻¹). Después de dos horas de incubación, se colectaron las células tanto de los controles como las de los choques salinos.

4.2.2 Choque térmico Los cultivos control se mantuvieron en incubación a 29 °C. El tratamiento de choque térmico se aplicó a dos de los cultivos en los medios YPD ó YPG en la fase de crecimiento exponencial, al colocarlos en un horno de calentamiento a 80 °C por 12 min, en ese tiempo los cultivos alcanzaron una temperatura de 35 °C, la temperatura se registró con un termómetro cuyo margen de medición es de -20 a 110 °C (Brannan) y se transfirieron a un baño maría a 35 °C por 45 min. Después los cultivos se incubaron a 29 °C en agitación a 250 rpm y se incubaron por 1 hora más, en ese momento se colectaron las células.

4.2.3. Efecto combinado de choque salino y térmico. Los cultivos control crecieron en ausencia de sales y a 29 °C. Para el tratamiento del efecto combinado de un choque salino y térmico, en primer lugar se aplicó el choque salino (4.2.1) e inmediatamente los

Esquema del diseño experimental para aplicar choque salino, térmico y del efecto combinado de choque salino y térmico, utilizando como fuente de carbono glucosa y galactosa.

Fuente de carbono

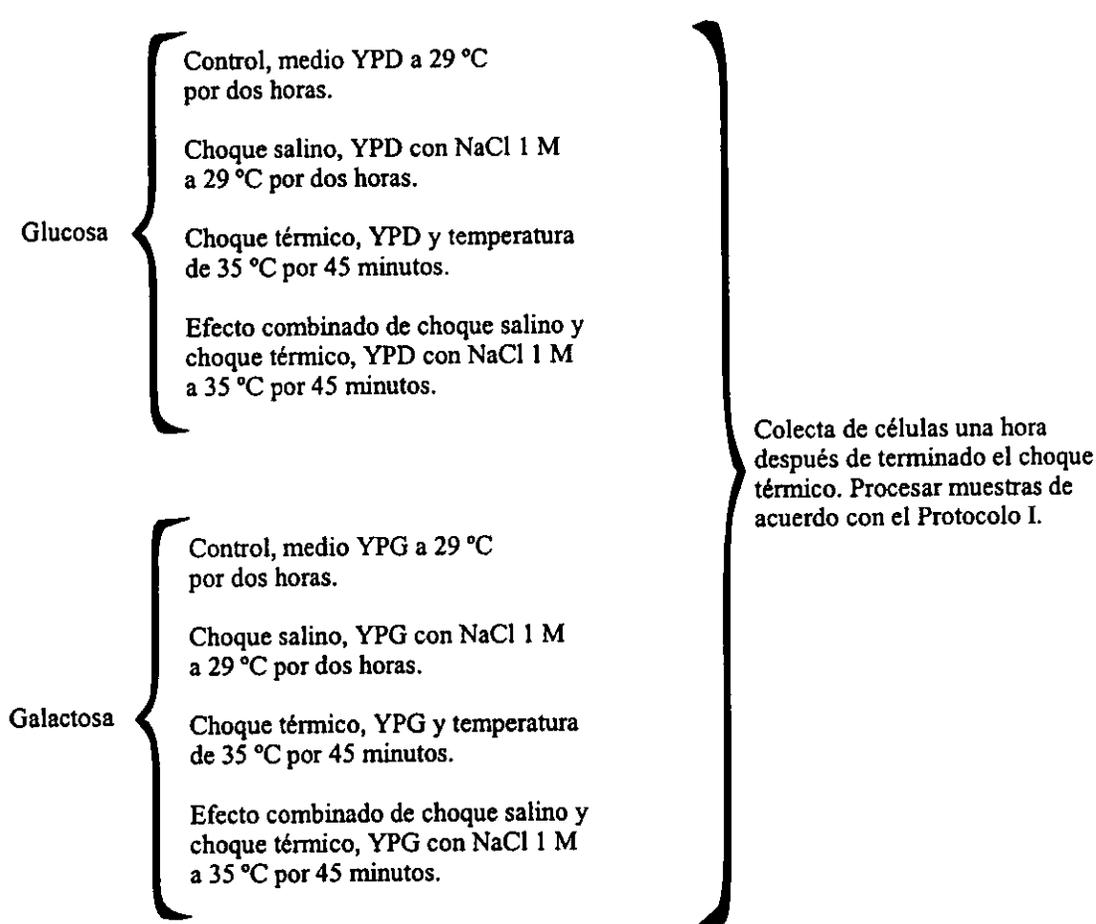


Figura 1. Esquema del diseño experimental de los tratamientos de choque salino, térmico y del efecto combinado de choque salino y térmico en presencia de glucosa y galactosa.

cultivos fueron expuestos al choque térmico (4.2.2).

4.3. Protocolo I para la extracción de proteínas en *D. hansenii*.

La extracción de proteínas de las células de *D. hansenii* expuestas a los tratamientos de la sección 4.2 se realizó de acuerdo con el protocolo I (Figura 2), que incluye los siguientes pasos:

4.3.1. Colecta de las células. Las células fueron recuperadas por centrifugación en una centrífuga Sorval RC-5B a $1\ 500 \times g$ por 5 min a $4\ ^\circ\text{C}$. Cada paquete celular se resuspendió en 30 ml del amortiguador TrED [TEA 10 mM, EDTA 1 mM, ditioneitol 1 mM, pH de 7.5, PMSF 200 μM y pepstatin A 1 μM como inhibidores de proteasas] (André *et al.*, 1991).

4.3.2. Lisis celular. Para romper las células se utilizó una prensa de French (SLM Aminco), con una capacidad de presión de 20 000 psi, un cilindro de 7.62 cm de diámetro y un pistón de 2.54 cm de diámetro. Se aplicó una presión de 16 211 psi equivalentes a 11.03×10^7 Pa (Jazwinski, 1990) a $4\ ^\circ\text{C}$, repitiendo el proceso tres veces. La lisis de las células se verificó por observación al microscopio, comparando las células antes y después del proceso. En la muestra de células intactas solo se observaron células con brillo y en la muestra de células rotas, se observaron células oscuras y gran cantidad de fragmentos celulares.

4.3.3. Fraccionamiento de proteínas por precipitación con sulfato de amonio. Con el rompimiento celular se obtuvo un homogeneizado que se centrifugó a $2\ 300 \times g$ por 5 min a $4\ ^\circ\text{C}$. El precipitado se desechó (contiene las células que no se rompieron y restos de pared celular). El sobrenadante se centrifugó a $21\ 000 \times g$ por 4 horas a $4\ ^\circ\text{C}$ y el precipitado se almacenó a $-70\ ^\circ\text{C}$ (fracción con proteínas asociadas a la membrana del citoplasma). El sobrenadante se trató con sulfato de amonio a 50% de saturación, la muestra se mantuvo por 15 min en agitación ligera y a $4\ ^\circ\text{C}$, después se centrifugó a $10\ 000 \times g$ por 5 min a $4\ ^\circ\text{C}$, se tomaron alícuotas del sobrenadante y precipitado para cuantificar proteínas y realizar una electroforesis.

4.3.4. Cuantificación de proteínas. La concentración de proteínas de las muestras obtenidas, se determinó con el método de Bradford, utilizando un sistema comercial para proteínas (BioRad). Se prepararon estándares de albúmina de suero bovino (BSA fracción

Diagrama del Protocolo I.

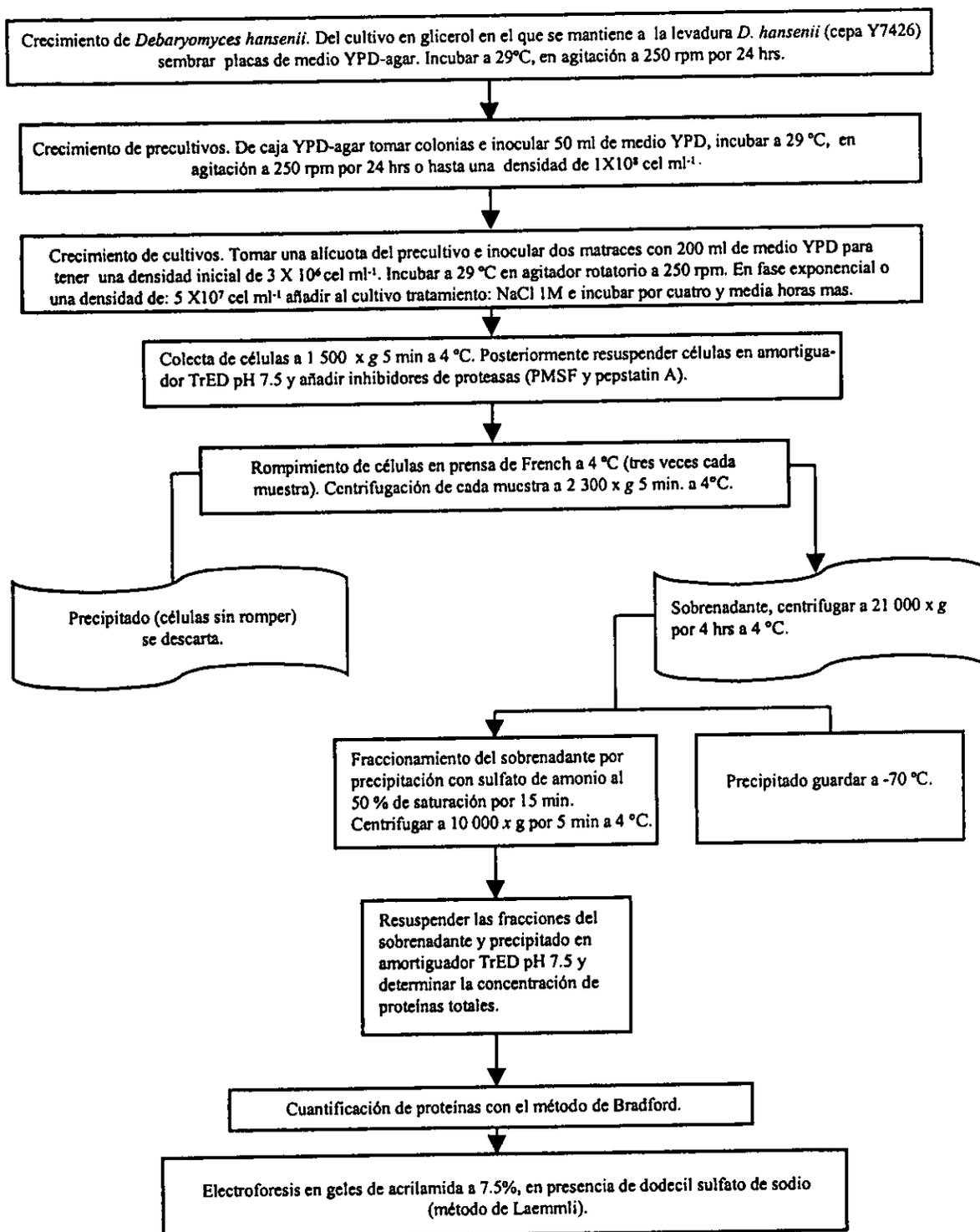


Figura 2. Diagrama del Protocolo I para la extracción de proteínas en *D. hansenii*.

V) (Sigma) en un margen de concentraciones de 5 a 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. En tubos de ensayo de 15 ml se colocaron: 1.0 ml del estándar o de la muestra diluidos 1:100 y 3 ml de reactivo de Bradford diluido 1:10. Se incubó por 30 min y se midió la densidad óptica a 595 nm en un espectrofotómetro UV-VIS modelo DW-2 (SLM Aminco).

4.3.5. Electroforesis. Las electroforesis se realizaron de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Se prepararon geles de acrilamida a 7.5%. Las muestras se diluyeron con mezcla de reacción (Tris 125 mM, pH de 6.8, SDS al 4%, glicerol al 20%, mercapto-etanol al 10% y azul de bromofenol al 0.002%) a una concentración de proteína igual para cada muestra. Posteriormente se incubaron en baño maría a 90 °C por un minuto, se centrifugaron 15 seg a 1 500 x g en una microcentrifuga modelo Marathon micro A (Fisher Scientific) y se aplicó a cada pozo del gel 50 μg de proteína total.

Al inicio de la electroforesis se aplicó un voltaje constante de 20 volts con una fuente de poder modelo EC500-90 hasta que el colorante azul de bromofenol (utilizado como indicador de migración) llegó al gel de separación, posteriormente se aumentó el voltaje a 40 volts . Cuando el indicador llegó al final del gel, se mantuvo el voltaje a 40 volts por una hora más (para lograr una mejor separación de las bandas de proteínas en el gel). Los geles se fijaron con una solución de TCA (10%) e isopropanol (25%) por una hora, se tñieron con una solución de azul de Coomasie al 0.25%, metanol 50% y ácido acético 10% (Sigma) 30 min y se destñieron con una solución de metanol (30%) y ácido acético (10%) por 24 horas. Después de este tratamiento, los geles se secaron en un sistema de alto vacío modelo 583 (Bio Rad). Para cada uno de los geles se utilizaron marcadores de proteínas de alto y/o bajo peso molecular para geles de poli(acrilamida)-SDS (Sigma). La estimación de los pesos moleculares de las bandas de proteína se describe posteriormente en el apartado de análisis de geles de acrilamida por densitometría (4.8).

4.4. Marcaje radiactivo de proteínas con metionina [^{35}S].

Para evaluar la expresión de proteínas después de un choque salino mediante un marcaje radiactivo con metionina [^{35}S], se prepararon precultivos en matraces Erlenmeyer de 300 ml con 50 ml de medio sintético completo, sin metionina (SC) [medio mínimo sintético con base nitrogenada, vitaminas y sales inorgánicas sin histidina, metionina y

triptófano (Difco)] y glucosa (2%); otro con YPM y YPM, NaCl 1.5 M. Los precultivos se incubaron por 24 horas a 30° C en un agitador rotatorio a 250 rpm.

4.4.1. Choque salino. En los cultivos del control y del tratamiento, las células se cultivaron en tubos falcon de 15 ml con 5 ml de medio SC; con una densidad celular inicial de 6×10^6 cel ml⁻¹ en presencia de 50 µCuries de L-metionina [³⁵S] grado para marcaje *in vivo* y una actividad específica de 1180 Curies/mmol (Amersham Pharmacia Biotech), sin metionina fría y en el tratamiento del choque salino se añadió NaCl 1.5 M. Los cultivos se incubaron por 5 horas a 30 °C en agitador rotatorio a 250 rpm.

4.4.2. Estrés salino constante. Los cultivos del control y del tratamiento se hicieron en tubos falcon de 15 ml con 10 ml de medio YPM se añadieron 100 µCuries de L-metionina [³⁵S], sin metionina fría y células del precultivo YPM sin sales para iniciar el cultivo con una densidad celular de 7×10^6 cel ml⁻¹. En el tratamiento del estrés salino constante, se utilizaron las células del precultivo YPM, NaCl 1.5 M y se añadió NaCl 1.5 M. Estos cultivos se incubaron por 15 horas a 30 °C en agitación continua a 250 rpm.

Para determinar la incorporación de metionina [³⁵S], se colocaron 40 µl de cada una de las muestras en tubos eppendorf limpios, a los que se añadió 760 µl de agua destilada, 200µl de TCA al 30% y se mantuvieron en un baño de hielo por una hora para precipitar las proteínas. Al final de la incubación, las muestras fueron vertidas sobre filtros de fibra de vidrio en un multifiltro (Millipore) y se lavaron con TCA al 8%, posteriormente se lavaron con acetona al 80% a 4 °C. Cada filtro se colocó en un vial y se le añadieron 5 ml de líquido de centelleo para determinar las cuentas por minuto en un contador de centelleo modelo LS6500 (Beckman).

En la electroforesis, las muestras de proteínas marcadas con [³⁵S] se aplicaron en cada pozo del gel con igual número de cuentas por minuto, se cargaron dos valores de cuentas por minuto 1×10^4 y 1×10^5 cpm, las electroforesis se realizaron de acuerdo con el protocolo II. Después de secar los geles en un sistema de alto vacío, estos se expusieron a película de rayos X BioMax (KODAK) por un período de 8 días para las muestras de 1×10^4 cpm y 4 días para las muestras de 1×10^5 cpm. Las películas de rayos X fueron reveladas en un sistema de revelado automático (KODAK) (Unidad de servicios de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular).

4.5. Tratamientos de un estrés salino u osmótico constantes.

Para evaluar la posible diferencia entre los efectos de un estrés salino u osmótico constantes en la expresión de proteínas de *D. hansenii*, se realizaron tratamientos en presencia de sales de Na⁺ y K⁺ como solutos de un estrés osmótico y iónico y en presencia de sorbitol como soluto de estrés osmótico. Los precultivos y cultivos se hicieron con maltosa como fuente de carbono, se inocularon matraces Erlenmeyer de 50 ml con 15 ml de medio YPM; YPM, NaCl 2 M; YPM, KCl 2 M y YPM, sorbitol 2 M. Los precultivos se incubaron a 30 °C en un agitador rotatorio a 250 rpm por 24 horas.

4.5.1. Estrés salino constante. Los precultivos del control y los tratamientos salinos se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml del medio YPM sin sales y YPM, NaCl 2 M ó YPM, KCl 2 M respectivamente.

4.5.2. Estrés osmótico constante. El precultivo del tratamiento osmótico se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml del medio YPM, Sorbitol 2M.

Los cultivos de los tratamientos de estrés salino u osmótico constantes se incubaron a 30 °C en agitación continua por 15 horas.

4.6. Protocolo II para la extracción de proteínas en células de *D. hansenii*.

La extracción de proteínas de las muestras obtenidas en los experimentos del marcaje radiactivo de proteínas (4.4) y de los tratamientos de un estrés salino u osmótico constantes (4.5) se realizaron de acuerdo con el protocolo II (Figura 3).

4.6.1. Colecta de células. Las células de cada uno de los cultivos se colectaron en una centrifuga SBV (Fisher Scientific) a 1 500 x g por 10 min y temperatura ambiente. El paquete celular se lavó con 1 ml de agua destilada a 4 °C dos veces y se transfirió a tubos eppendorf limpios. Las células lavadas se resuspendieron al 50% de su peso en amortiguador de lisis [EDTA (1mM), Tritón X-100 (2%), SDS (1%), MES-TEA (10 mM) pH 6 y PMSF (1mM)].

4.6.2. Lisis celular. El rompimiento celular se realizó en la suspensión celular con la adición de 0.4 g de perlas de vidrio en un agitador tipo Vortex modelo Genie-2 (Scientific Industries) por 2 min y luego se mantuvieron en un baño de hielo por 6 min (para evitar calentamiento de la muestra); la agitación se repitió tres veces hasta un total de 6 min. Finalmente los tubos se centrifugaron en una microcentrífuga (Beckman) a 8740 x g por

Diagrama de Protocolo II.

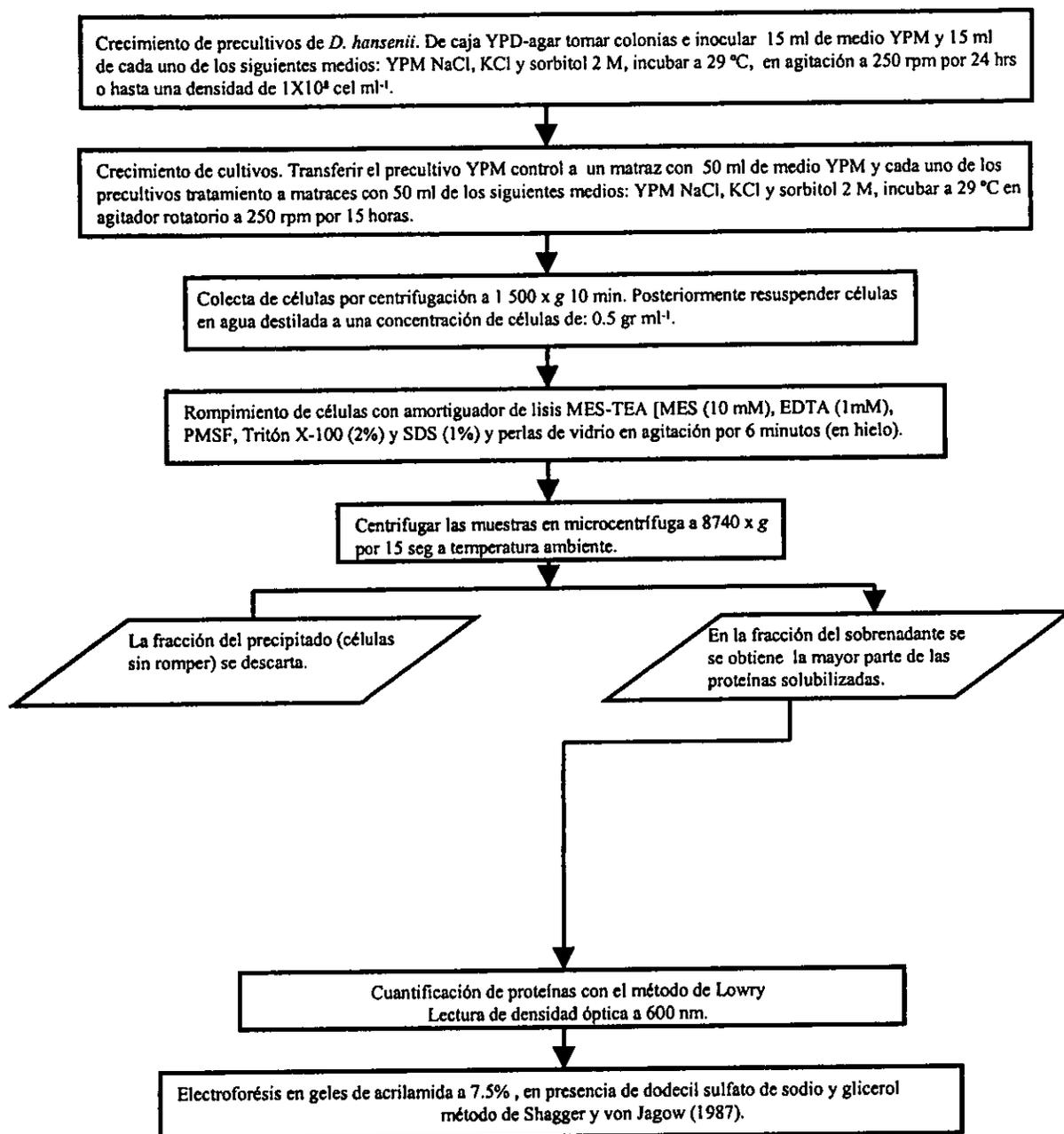


Figura 3. Diagrama del Protocolo II para la extracción de proteínas en *D. hansenii*.

15 seg a temperatura ambiente y el sobrenadante de cada muestra se transfirió a tubos eppendorf limpios; estas muestras fueron colocadas en un baño de hielo hasta la determinación de proteínas o hasta su aplicación en los geles de poliacrilamida para realizar electroforesis.

4.6.2. Cuantificación de proteínas. La concentración de proteínas se determinó con el método de Lowry (1951). Se prepararon estándares de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma) en concentraciones de 5 a 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Después se mezclaron 1 ml del estándar o de la muestra diluidos 1:100 con 3 ml de solución C de Lowry (solución A [Na_2CO_3 (2%), NaOH (0.4%), $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6$ (0.16%)] y solución B [CuSO_4 (4 %)] en una proporción 100:1) y 0.3 ml de solución de Folin (Sigma) diluido 1:1 con agua destilada. Después de 30 min se midió la densidad óptica a 660 nm en un espectrofotómetro UV-VIS.

4.6.3. Electroforesis. Las electroforesis para este protocolo se realizaron de acuerdo con el método de Shagger y von Jagow (1987), que incluye glicerol y triscina en la elaboración del gel de separación y triscina en el amortiguador del cátodo. Las electroforesis se llevaron a cabo en una celda mini Protean II xi, de 7X10 cm (Bio Rad), con geles a una concentración de 7.5% de acrilamida. Al inicio de la electroforesis se aplicó un voltaje constante de 40 volts hasta que el azul de bromofenol llegó al gel de separación, en ese momento se aumento el voltaje a 80 volts, cuando el colorante llegó al final del gel, se mantuvo el voltaje a 80 volts por dos horas mas. Después de la electroforesis los geles se fijaron y tiñieron como en el protocolo I (4.3.5).

4.7. Fraccionamiento celular.

Para determinar la posible localización de las proteínas con un cambio de expresión en los tratamientos de un estrés salino u osmótico constantes (4.5), se realizó un fraccionamiento celular por centrifugación (Figura 4), se obtuvieron precultivos y cultivos de *D. hansenii* de acuerdo con el Protocolo II (4.6). Las células de cada cultivo se colectaron por centrifugación en una centrifuga clínica IEC (International Equipment Company) a 965 x g por 10 min a temperatura ambiente, el paquete celular se lavo con 1 ml de agua destilada a 4 °C dos veces y se transfirió a un tubo eppendorf limpio, las células lavadas se resuspendieron al 50% de su peso en el amortiguador MES-TEA 10 mM pH 6 y sorbitol 0.6 M. Las células de cada muestra se rompieron con 0.3 g de perlas de vidrio y PMSF (1mM), con agitación en agitador tipo Vortex modelo Genie-2 (Scientific Industries) 2 min y luego en baño de hielo por 6 min, la agitación se repitió tres veces para cada muestra hasta un total de 6 min. Después de la lisis celular las muestras se centrifugaron a 1, 460 x g por 10 min a 4 °C en una centrifuga MR 18.12 (Jouan) con un rotor de ángulo fijo. El sobrenadante de cada muestra se colocó en tubos eppendorf limpios. Con estos sobrenadantes se inició el fraccionamiento celular de proteínas por centrifugación que consistió en la centrifugación de los sobrenadantes a 17 000 x g por 30 min a 4 °C en una ultra centrifuga (Beckman) con un rotor de ángulo fijo modelo TL 100.2. El precipitado que se obtuvo (fracción con las proteínas de la mitocondria) se resuspendió en 50 µl de amortiguador MES-TEA pH 6 y Sorbitol 0.6 M, el sobrenadante se centrifugó a 34 500 x g por 45 min a 4 °C, consiguiéndose dos fracciones: Sobrenadante (fracción de proteínas de citoplasma) y precipitado (fracción de proteínas de la membrana plasmática), estos se resuspendieron en 50 µl de amortiguador MES-TEA pH6 y Sorbitol 0.6M.

De cada sobrenadante y precipitado que se obtuvieron con el fraccionamiento de proteínas, se tomaron dos alícuotas una se utilizó para la determinación de la concentración de proteínas totales y la otra se utilizó para realizar la electroforesis respectiva. La determinación de la concentración de proteínas y la electroforesis se hicieron de acuerdo con el protocolo II (4.6).

Fraccionamiento celular.

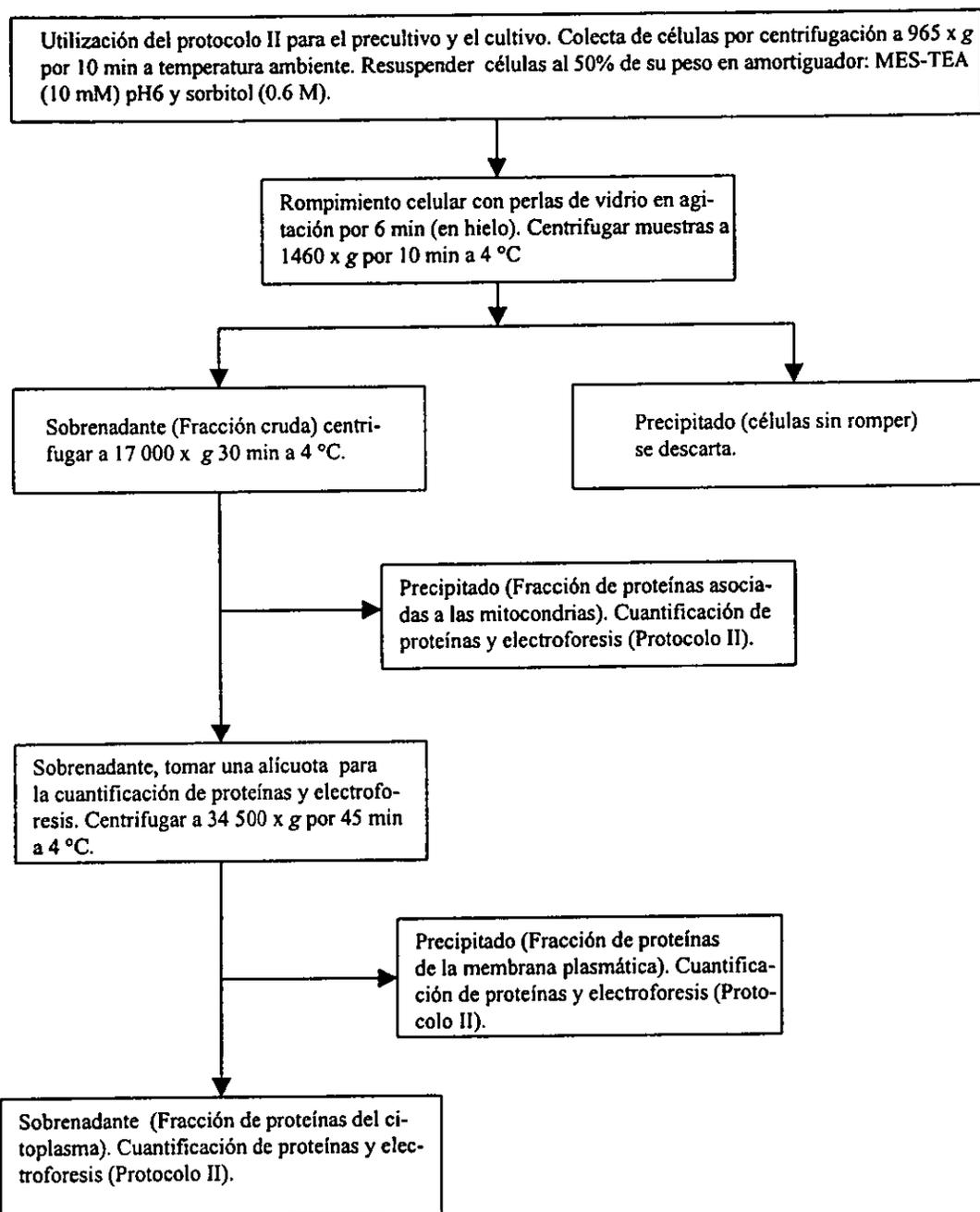


Figura 4. Diagrama del fraccionamiento celular por centrifugación.

4.8. Análisis de los geles de acrilamida por densitometría.

Los geles fueron analizados en un densitómetro Modelo GS-690 Imagin Densitometer (Bio Rad). Los geles teñidos con azul de Coomassie se visualizaron con la opción del filtro rojo, con un margen de valores de longitud de onda de 595 a 750 nm, y los radiogramas correspondientes a los geles con muestras de proteínas marcadas con metionina [³⁵S] se analizaron con la opción de filtro escala de grises, con un margen de valores de longitud de onda de 400 a 750 nm. El densitómetro es un fotómetro modificado que detecta la luz o radiación que es transmitida o reflejada por las bandas de proteína en el gel. El programa Multi-Analyst versión 1.1 digitaliza los datos de absorbancia y muestra los siguientes valores: coordenadas en los ejes X, Y y Z, que indican la posición horizontal, vertical y la intensidad de la banda de proteína en el gel respectivamente. Las unidades de las coordenadas X y Y son milímetros o centímetros, las unidades de la coordenada Z son unidades de densidad óptica. El programa estima los pesos moleculares de las bandas de proteína que hay en cada carril de un gel, a partir de un análisis de regresión lineal negativo (nivel de confianza del 98%) con los datos de movilidad relativa (valores de las coordenadas X y Y) de los estándares de proteínas de peso molecular conocido y el log₁₀ de su peso molecular. También muestra una gráfica de la densidad óptica contra la movilidad relativa de las proteínas en cada carril de un gel, en la gráfica cada banda de proteína es representada como una curva con altura y área definidas.

Los datos de altura y área de las gráficas obtenidos, se exportaron al programa de gráficos Microcal Origin version 5, para su análisis. En este programa se hizo un ajuste de la línea de base de cada gráfica, también se suavizaron las gráficas de cada gel, con el método de promedios adyacentes. Los datos obtenidos se normalizaron con su control respectivo. A partir de los datos normalizados se obtuvo la altura de cada pico (cuando la muestra incluye proteínas sin purificar es preferible utilizar los datos de altura en lugar de área, que solo se recomiendan para muestras con proteínas puras), correspondiente a las bandas de proteína y una relación de la diferencia entre las alturas de las bandas de proteína de los tratamientos y las del control respectivo. Se definió como cambio significativo de la expresión de proteínas, cuando el valor de la relación de cada banda fue mayor ó igual a 0.5 veces con respecto al control.

5. RESULTADOS.

Crecimiento de *D. hansenii* en condiciones experimentales. Con objeto de determinar las condiciones de cultivo de la levadura *D. hansenii* en las condiciones experimentales, se llevaron a cabo curvas de crecimiento en cultivos con medio YPD con una duración de hasta 42 horas, en presencia y ausencia de sales de Na^+ y K^+ . Los cultivos se iniciaron con una densidad celular de 3×10^6 cels ml^{-1} , considerando como indicador del crecimiento el número de células por mililitro. La Figura 5 muestra las curvas de crecimiento obtenidas para *D. hansenii* en ausencia y presencia de sales. Los valores del tiempo de duplicación se calcularon a partir de las curvas de crecimiento de tres experimentos independientes, considerando únicamente la fase exponencial, y con ello se determinó el tiempo de colecta en los experimentos de choque salino. En las curvas de crecimiento con medio YPD sin sales se obtuvo un valor promedio del tiempo de duplicación de 3:30 horas y en las curvas de crecimiento de los tratamientos con medio YPD y NaCl ó KCl 1 M se obtuvieron valores promedio del tiempo de duplicación de 4:30 horas y 4:20 horas respectivamente. Con estos valores del tiempo de duplicación se estableció que el tiempo de incubación una vez que se añadiera NaCl 1M sería de cuatro y media horas.

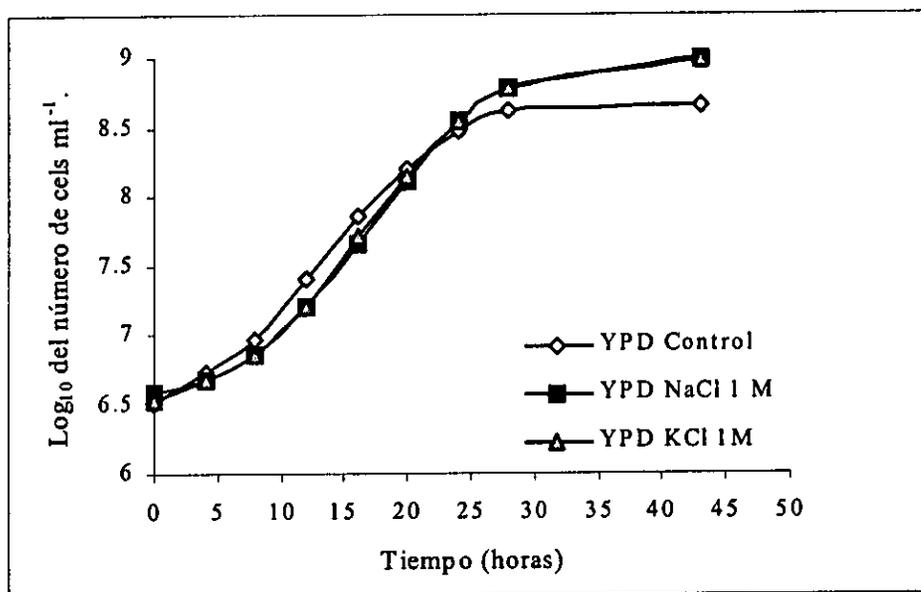


Figura 5. Curvas de crecimiento de *D. hansenii* en diferentes condiciones experimentales de cultivos. Datos típicos de un experimento.

Expresión de proteínas después de choque salino o térmico.

Para evaluar el efecto de choque salino, térmico o ambos en presencia de dos fuentes de carbono distintas sobre la expresión de bandas de proteína, se diseñaron dos experimentos con tres tratamientos cada uno (Figura 1). En uno de los experimentos se utilizó glucosa y en el otro se utilizó galactosa. En el primer tratamiento células de *D. hansenii* fueron expuestas a un choque salino con NaCl 1 M; en el segundo se aplicó un choque térmico, que consistió en cambiar la temperatura del cultivo de *D. hansenii* de 29°C a 35 °C por 45 minutos; y en el tercero se incluyó el efecto combinado de choque salino y térmico, en el cual *D. hansenii* fue expuesta a NaCl 1M y a un cambio de temperatura de 29°C a 35 °C por 45 minutos.

La extracción de las proteínas en las muestras del control y tratamientos se realizó de acuerdo con el protocolo I (Figura 2) hasta la obtención de un sobrenadante inicial después de centrifugar a 21 000 x g por 4 horas a 4 °C. Las gráficas obtenidas por medio del análisis de densitometría de los geles con muestras de proteínas totales de las fracciones crudas de los tratamientos arriba mencionados se presentan agrupadas en las Figuras 6 y 7 de acuerdo con la fuente de carbono que se utilizó.

En la Figura 6 se presentan las gráficas donde se utilizó glucosa como fuente de carbono. En general en estas gráficas solo se observan cambios menores en la expresión de bandas de proteína con respecto al control, sin embargo es importante señalar estos cambios. Se encontró similitud en algunos de los valores de peso molecular de las bandas de proteína con un cambio de expresión en cada tratamiento; como las bandas de proteína de 47, 49 ± 1 y 112 kDa cuya expresión aumentó en el tratamiento de choque salino (Figura 6-a) y en el tratamiento del efecto combinado de choque salino y térmico (Figura 6-c), la presencia de estas tres bandas en ambos tratamientos indica que son una respuesta a choque salino, porque se inducen con el efecto combinado de salinidad y temperatura; por el contrario la banda de 78 kDa que aumento en el tratamiento de choque térmico (Figura 6-b) y del efecto combinado (Figura 6-c) sugiere que es una proteína de respuesta a choque térmico; mientras que la banda de 44 kDa que aumentó sólo en presencia de choque térmico (Figura 6-b), probablemente sea una proteína de respuesta a un choque térmico que no se induce en presencia de un efecto combinado.

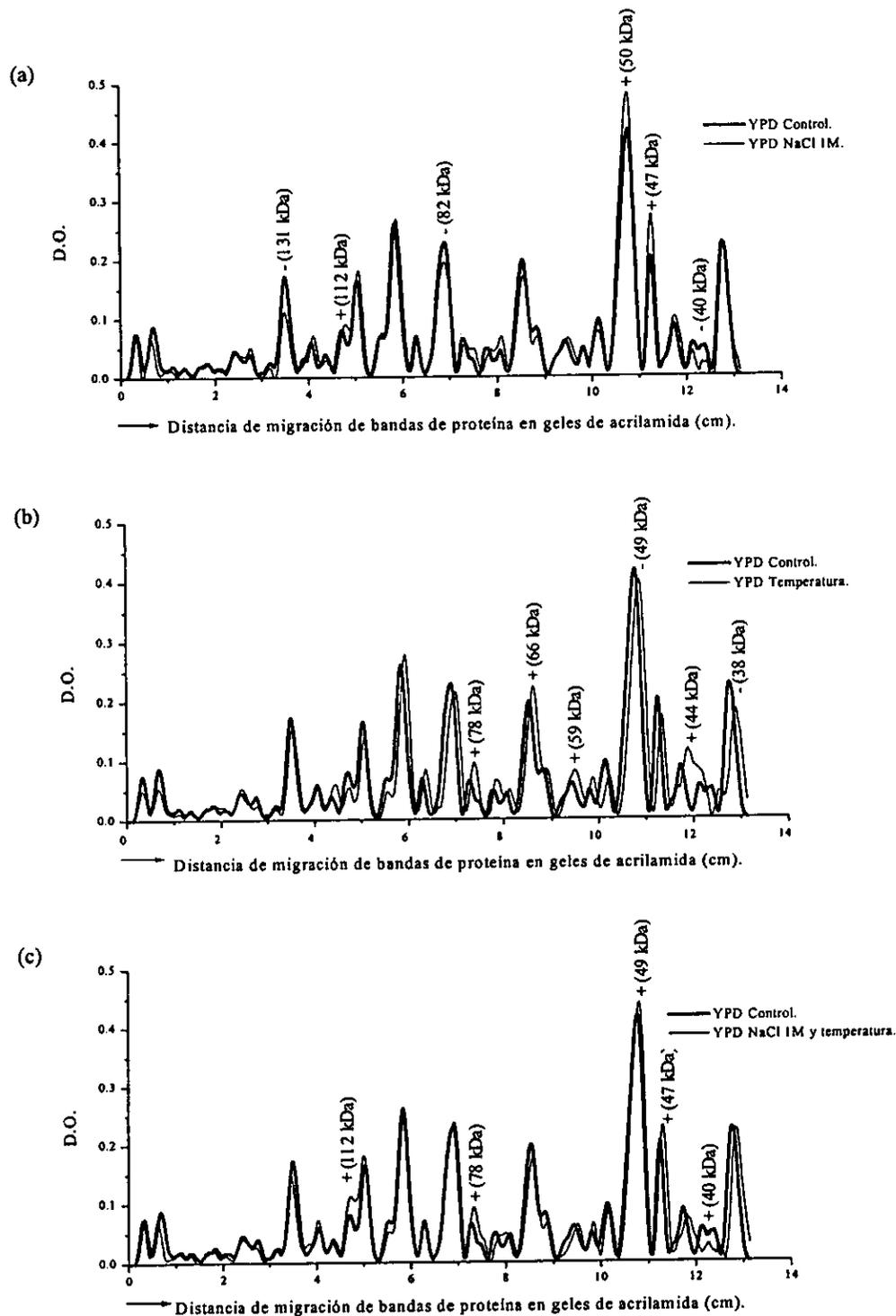


Figura 6. Patrones de bandas de proteína obtenidos mediante electroforesis y analizados por densitometría, en células de *D. hansenii* creciendo en medio YPD. Fracciones crudas de (a) Choque salino, (b) Choque térmico y (c) Efecto combinado de choque salino y térmico. La flecha indica la dirección de la migración de las bandas de proteína en el gel durante la electroforesis. Los símbolos (+, -) señalan el aumento y la disminución de la banda de proteína con respecto al control, el peso molecular de las bandas de proteína que cambian se muestra entre paréntesis.

Al sustituir la fuente de carbono por galactosa (Figura 7), se observó en los tres tratamientos el aumento significativo en la expresión de una banda de proteína de 40 ± 1 kDa es probable que el aumento de esta banda sea una respuesta general a condiciones de choque salino y/o térmico.

En el tratamiento de choque salino (Figura 7-a) y del efecto combinado (Figura 7-c), se observó el aumento en la expresión de dos bandas de proteína de 42 y 44 kDa, mientras que en presencia del choque térmico (Figura 7-b) estas bandas disminuyeron. El aumento en los dos tratamientos sugiere que estas dos bandas de proteína son una respuesta específica para choque salino.

En lo relativo a los tratamientos de choque térmico y del efecto combinado, los cambios mas importantes fueron el aumento en la expresión de una banda de proteína de 52 kDa y la disminución de una banda de 57 kDa (Figura 7-b y c) que en condiciones de choque salino (Figura 7-a) no presentaron un cambio apreciable, el cambio específico de estas bandas de proteína en condiciones de choque por temperatura y de un efecto combinado sugiere que son proteínas de respuesta específica a choque térmico. En este tratamiento de choque térmico también se observó el aumento significativo de tres bandas de proteína de 65, 78 y 82 ± 1 kDa, pero no en el efecto combinado debido probablemente a que estas proteínas son mas sensibles al efecto de sal que al de temperatura, sin embargo se considera que su aumento es una respuesta específica a choque térmico.

Estos resultados sugieren que no existe un conjunto común de proteínas que se modifique cuando las células de *D. hansenii* son expuestas a un estrés salino o térmico. Es decir, el cambio en la expresión de proteínas es específico y diferente para cada tipo de estrés.

Por lo que respecta a la fuente de carbono utilizada, se confirmó que hay una diferencia en los patrones de expresión de proteínas, ya que en presencia de glucosa los cambios que se observaron fueron mínimos en comparación a los cambios observados en presencia de galactosa; esto indica que *D. hansenii* posiblemente es más sensible a choque salino o térmico cuando crece en un medio con galactosa.

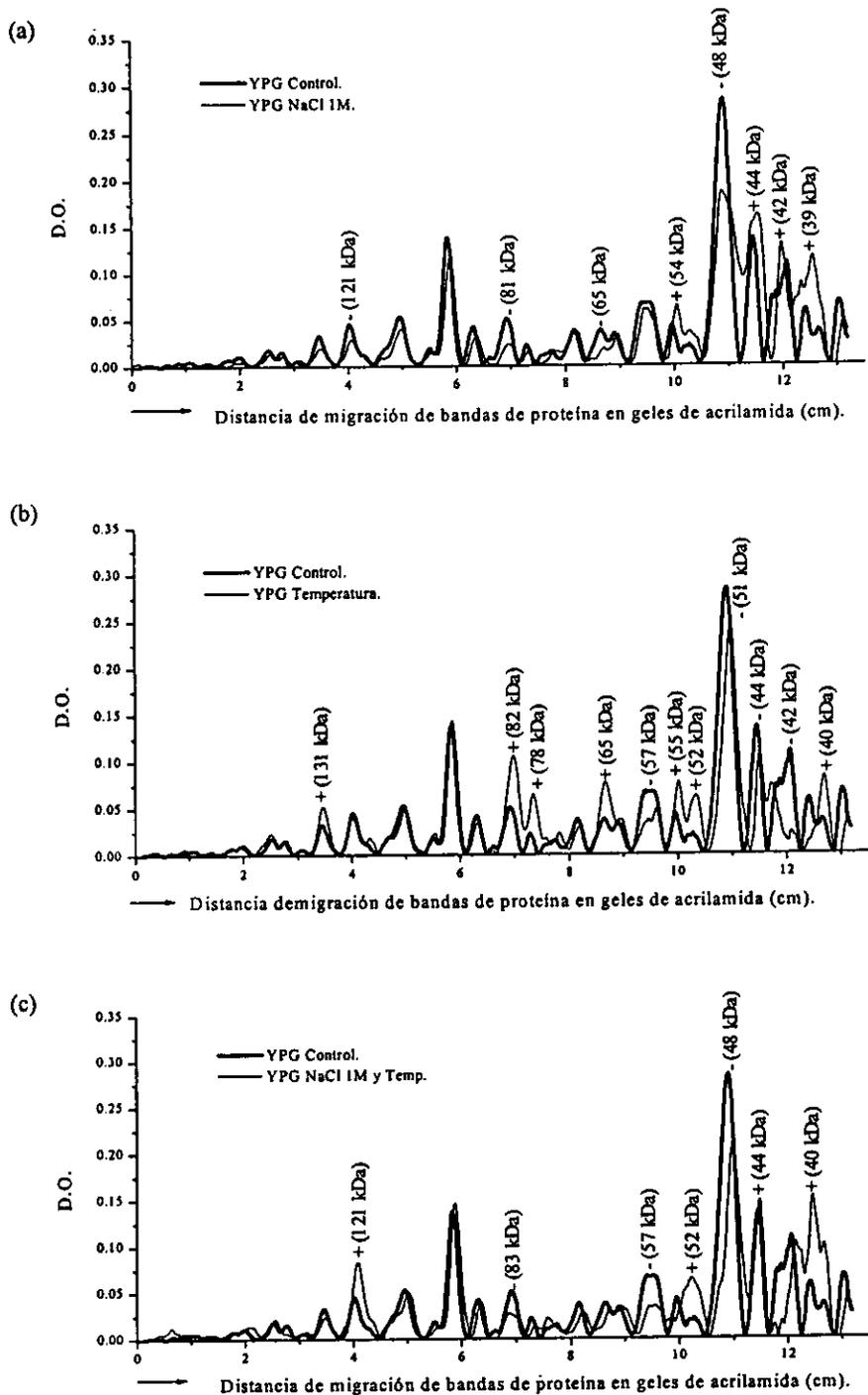


Figura 7. Patrones de bandas de proteína obtenidos mediante electroforesis y analizados por densitometría, en células de *D. hansenii* creciendo en medio YPG. Fracciones crudas de (a) Choque salino, (b) Choque térmico y (c) Efecto combinado de choque salino y térmico. La flecha indica la dirección de la migración de las bandas de proteína en el gel durante la electroforesis. Los símbolos (+, -) señalan el aumento y la disminución de la banda de proteína con respecto al control, el peso molecular de las bandas de proteína que cambian se muestra entre paréntesis.

Determinación de la expresión de proteínas después de choque salino mediante fraccionamiento por precipitación con sulfato de amonio.

Para obtener una mejor separación de las bandas de proteína que presentaron un cambio en su expresión durante condiciones de choque salino se incluyó en el protocolo I el fraccionamiento por precipitación con sulfato de amonio, después de centrifugar las muestras a 21, 000 x g, los sobrenadantes se trataron con sulfato de amonio a 50% de saturación (Figura 2). La figura 8 muestra las gráficas que se obtuvieron luego del análisis por densitometría del gel correspondiente a las fracciones anteriores.

Al comparar las tres gráficas de la figura 8, se observó que las bandas de proteína de 43, 66, 81, y 190 kDa, que presentaron cambios menores en su expresión antes del fraccionamiento por sulfato de amonio (Figura 8-a) luego del fraccionamiento se ven enriquecidas; en la fracción del sobrenadante (Figura 8-b) se observó el aumento de las bandas de proteína de 41, 43, 57, 66, 81, 141 y 165 kDa y en la fracción del precipitado (Figura 8-c) se observó el aumento de las bandas de 35, 43, 66, 125, 134 y 188 kDa.

Estos resultados sugirieron la separación efectiva de proteínas con el corte de sulfato de amonio a 50 % de saturación.

Marcaje de proteínas con metionina [³⁵S] después de choque salino.

Se realizó un marcaje radioactivo de proteínas con metionina [³⁵S] en condiciones de choque salino y se consideró el incremento en la concentración de NaCl para aumentar los cambios en la expresión de proteínas luego de un choque salino. En este marcaje radioactivo de proteínas, se utilizó el medio SC, NaCl 1.5 M y 50 µCi de L-metionina [³⁵S] las células se colectaron después de cinco horas de incubación. La figura 9 muestra la gráfica del análisis por densitometría del radiograma obtenido a partir del gel con muestras del control y del tratamiento. En esta gráfica se observó el aumento de cuatro bandas de proteína de 70, 92, 107 y 153 kDa y la disminución de siete bandas de 39, 44, 50, 61, 79, 116 y 184 kDa. Las bandas de proteína que tuvieron un cambio significativo fueron las bandas de 39, 44, 79 y 153 kDa. La reducción en el número de bandas de proteína sugiere que la concentración de metionina [³⁵S] no fue suficiente para asegurar su incorporación en todas las proteínas que se sintetizaron después del choque salino; sin embargo este resultado también sugiere que *D. hansenii* expuesta a las condiciones de choque salino

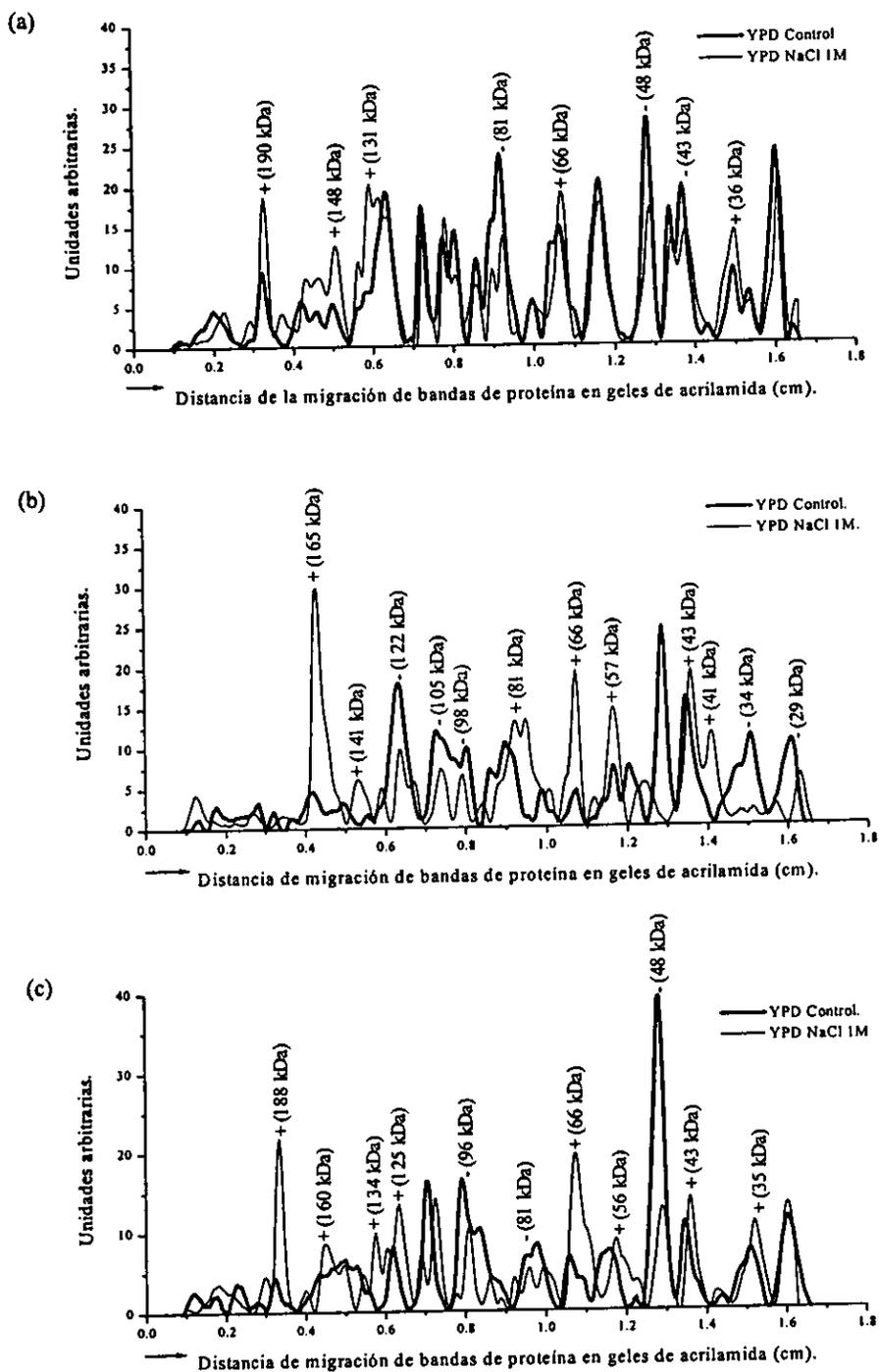


Figura 8. Patrones de bandas de proteína obtenidos mediante electroforesis y analizados por densitometría, en células de *D. hansenii* creciendo en medio YPD. (a) Fracciones del sobrenadante después de centrifugar a 21 000 x g. Fracciones obtenidas por el corte de sulfato de amonio a 50 % de saturación del (b) Sobrenadante y del (c) Precipitado. La flecha indica la dirección de la migración de las bandas de proteína en el gel durante la electroforesis. Los símbolos (+,-) señalan el aumento o la disminución de la banda de proteína con respecto al control, el peso molecular de las bandas de proteína que cambian se muestran entre paréntesis.

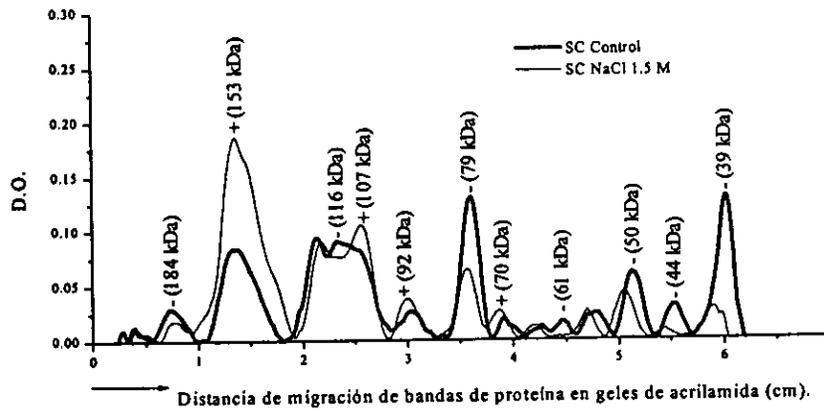


Figura 9. Patrones de bandas de proteína obtenidos mediante electroforesis y analizados por densitometría, en células de *D. hansenii* creciendo en medio SC. Fracciones crudas de proteínas marcadas radioactivamente con metionina [^{35}S], control y tratamiento de un choque salino con NaCl 1.5 M. La flecha indica la dirección de la migración de las bandas de proteína en el gel durante la electroforesis. Los símbolos (+,-) señalan el aumento o la disminución de la banda de proteína con respecto al control, el peso molecular de cada banda de proteína que cambió se muestra entre paréntesis.

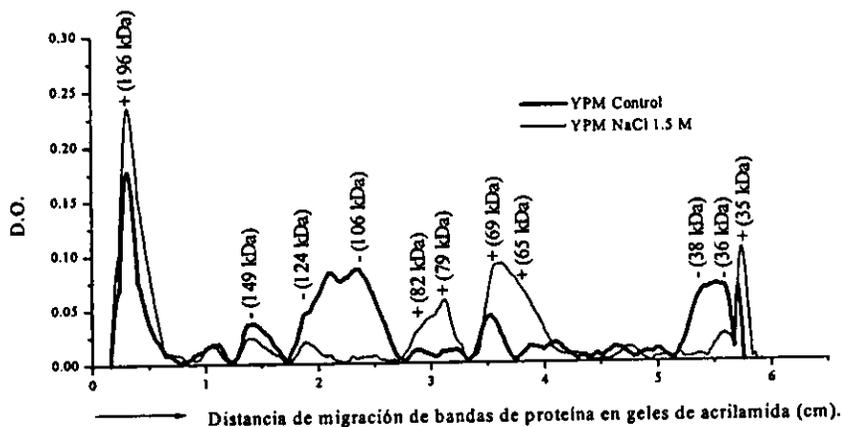


Figura 10. Patrones de bandas de proteína obtenidos mediante electroforesis y analizados por densitometría, en células de *D. hansenii* creciendo en medio YPM. Fracciones crudas de proteínas marcadas radioactivamente con metionina [^{35}S], control y tratamiento del estrés salino constante con NaCl 1.5 M. La flecha indica la dirección de la migración de las bandas de proteína en el gel durante la electroforesis. Los símbolos (+,-) señalan el aumento o la disminución de la banda de proteína con respecto al control, el peso molecular de cada banda de proteína que cambió se muestra entre paréntesis.

empleadas, no requiere de la síntesis de un gran número de proteínas para contrarrestar los efectos de un choque salino.

Marcaje de proteínas con metionina [³⁵S] en condiciones de estrés salino constante.

Para determinar los cambios en la expresión de proteínas en condiciones de estrés salino constante, se realizó un marcaje radioactivo de proteínas con L-metionina [³⁵S], para ello las células se cultivaron en medio YPM con NaCl 1.5 M y 100 µCi de metionina [³⁵S] por 15 horas. El análisis por densitometría del radiograma correspondiente al gel con muestras del control y del tratamiento se muestra en la figura 10. En la gráfica de esta figura, se observó el aumento de seis bandas de proteína de 35, 65, 69, 79, 82 y 196 kDa y la disminución de cinco bandas de proteína 36, 38, 106, 124 y 145 kDa. El cambio significativo de las bandas de proteína cuya expresión aumento después de incubar a las células por 15 horas, en las condiciones del estrés salino constante, sugieren que estas son las principales proteínas que *D. hansenii* sintetiza como respuesta a un estrés salino constante.

Expresión de proteínas en condiciones de estrés salino u osmótico constantes.

Para evaluar si el cambio en la expresión de las bandas de proteínas encontrado después de estrés salino era una respuesta celular debida a la presencia de sal o una respuesta celular debida a presión osmótica, se prepararon cultivos en los que células de *D. hansenii* se cultivaron en presencia de estrés salino constante por NaCl 2M ó KCl 2 M y la presencia de estrés osmótico constante con sorbitol 2 M. El análisis por densitometría del gel correspondiente se muestra en las gráficas de la Figura 11.

Al comparar los patrones de las bandas de proteína de los tratamientos del estrés salino constante (Figura 11-a y b) se observaron diferencias menores, es decir la mayoría de los pesos moleculares de las bandas de proteína que presentaron un cambio en su expresión fueron iguales en ambos tratamientos como el aumento de las bandas de proteína de 39, 44 ± 1, 50 ± 1, 90 y 97 kDa y la disminución de las bandas de proteína de 42, 62 y 161 ± 1 kDa; solo fueron diferentes una banda de proteína de 35 kDa, que aumentó en el tratamiento con NaCl 2 M (Figura 11-a) y dos bandas de proteína de 66 y 113 kDa en el tratamiento con KCl 2 M (Figura 11-b), la primera desapareció y la segunda aumentó.

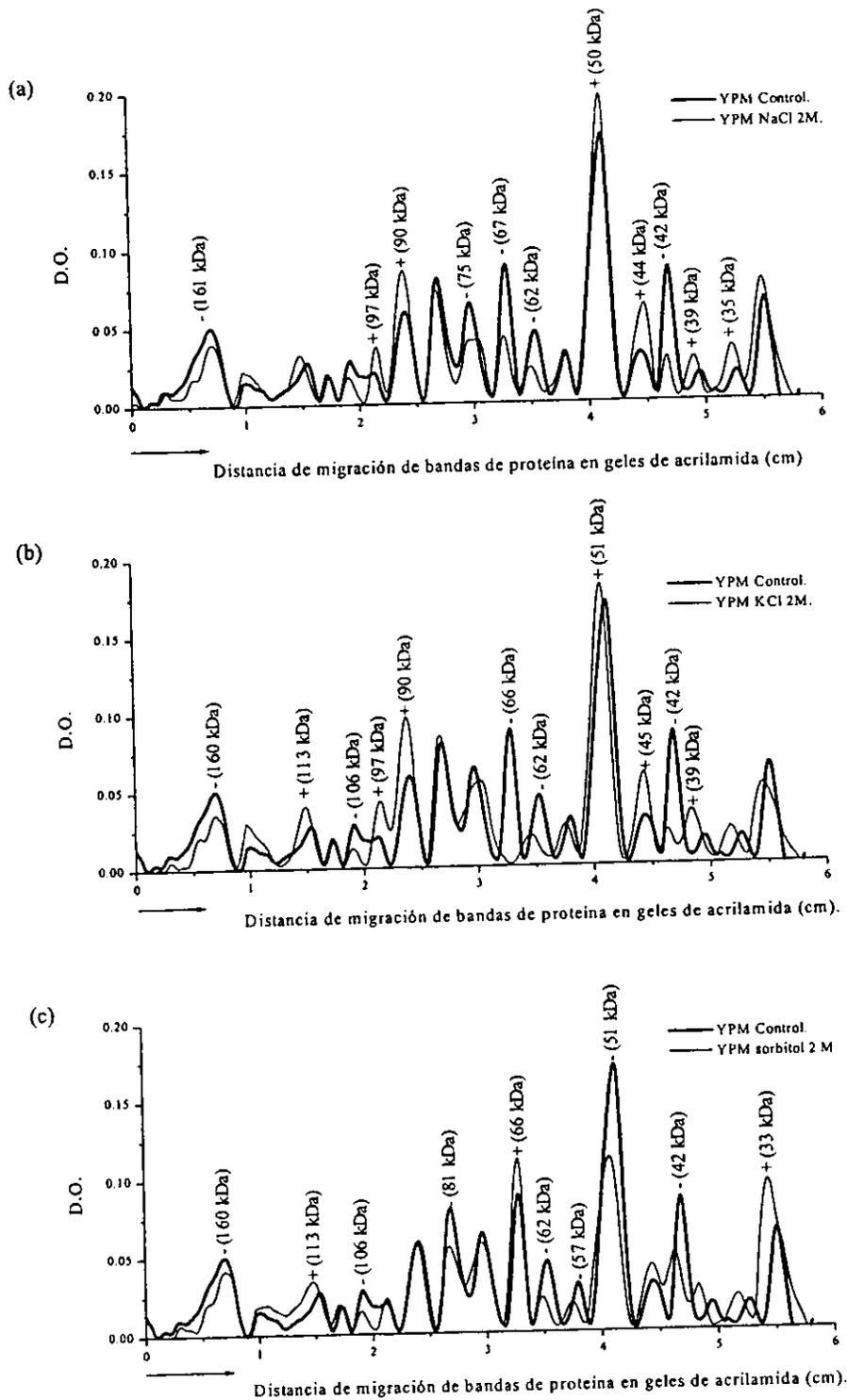


Figura 11. Patrones de bandas de proteína obtenidos mediante electroforesis y analizados por densitometría, en células de *D. hansenii* creciendo en medio YPM. Fracciones crudas, (a) Tratamiento con NaCl 2M, (b) Tratamiento con KCl 2M y (c) Tratamiento con sorbitol 2M. La flecha indica la dirección de la migración de las bandas de proteína en el gel durante la electroforesis. Los símbolos (+,-) señalan el aumento y la disminución de la banda de proteína con respecto al control, el peso molecular de cada banda de proteína que cambio se muestra entre paréntesis.

En la comparación de los patrones de las bandas de proteína de los tratamientos de estrés salino (Figuras 11-a y b) y osmótico constantes (Figura 11-c) se observó una diferencia mayor en el peso molecular de las bandas que aumentaron entre los tres tratamientos, especialmente en presencia del tratamiento con sorbitol 2 M aumentaron dos bandas de 33 y 66 kDa y disminuyeron tres bandas de proteína de 51, 57 y 81 kDa. Entre los tratamientos de NaCl 2 M y KCl 2M se observó mayor similitud en el cambio de expresión de las bandas de proteína que con cualquiera de los tratamientos de sal contra sorbitol. Estos resultados de forma general indican que *D. hansenii* incrementa o disminuye proteínas de forma muy diferente cuando el estrés es salino u osmótico, y al parecer *D. hansenii* tiene una respuesta similar a NaCl y KCl en las condiciones empleadas.

Al comparar los resultados obtenidos con los dos protocolos se estableció que el protocolo II modificado (Figura 3) mejora sustancialmente la observación de proteínas inducidas por estrés salino. En este protocolo se distingue el cambio en el amortiguador de lisis, la utilización de perlas de vidrio para el rompimiento celular y el uso del método de Shagger y von Jagow (1987) para la electroforesis. Este último permite una mejor separación de bandas de proteínas cuyo peso molecular va de 1 a 100 kDa.

Localización celular de las proteínas que se expresan significativamente en presencia de estrés salino u osmótico contantes.

Para determinar si la expresión de las bandas de proteína que se vieron modificadas en los tratamientos de NaCl, KCl y sorbitol 2 M está asociada a alguna fracción celular en particular, se llevo a cabo un fraccionamiento celular por centrifugación (Figura 4). A continuación se describen las gráficas de las fracciones que se obtuvieron con el análisis por densitometría de los geles respectivos.

En la figura 12, se muestran las gráficas de las fracciones del sobrenadante de cada tratamiento, después de centrifugar a 17 000 x g. En cada uno de los tratamientos se observaron cambios específicos en la expresión de proteínas, en el tratamiento con NaCl 2 M (Figura 12-a) aumentó una banda de proteína de 93 kDa, en el tratamiento con KCl 2 M (Figura 12-b) aumentó una banda de 60 kDa y disminuyó una banda de 57 kDa y en el tratamiento con sorbitol 2 M (Figura 12-c) apareció una banda de 43 kDa, aumento una

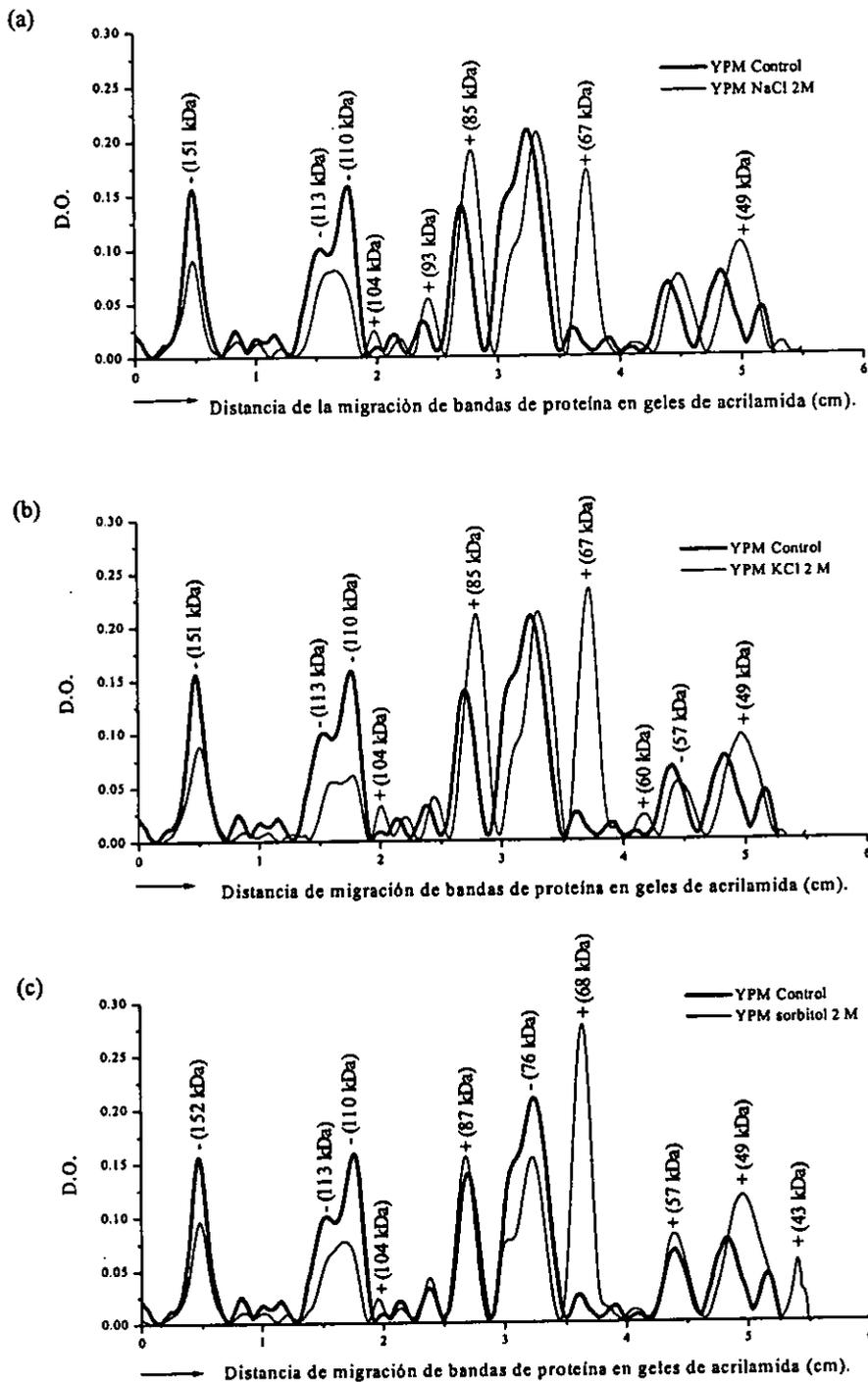


Figura 12. Patrones de bandas de proteína obtenidos mediante electroforesis y analizados por densitometría, en células de *D. hansenii* creciendo en medio YPM. Fracciones del sobrenadante después de centrifugar a 17 000 x g. (a) NaCl 2 M, (b) KCl 2 M y (c) sorbitol 2 M. La flecha indica la dirección de la migración de las bandas de proteína en el gel durante la electroforesis. Los símbolos (+,-) señalan el aumento o la disminución de la banda de proteína con respecto al control. El peso molecular de las bandas de proteína que cambian se muestra entre paréntesis.

banda de 57 kDa y disminuyó una banda de 76 kDa. Por lo que respecta a la similitud en los cambios de la expresión de proteínas, en los tres tratamientos se observó el aumento de cinco bandas de proteína de 49, 67 ± 1 , 85, 87 y 104 kDa y la disminución de tres bandas de 110, 113 y 151 ± 1 kDa. Estos cambios confirman que *D. hansenii* tiene proteínas específicas y de respuesta general al estrés salino u osmótico.

Las gráficas de las fracciones que corresponden al precipitado después de centrifugar a $17\ 000 \times g$, consideradas como proteínas asociadas a las mitocondrias, se muestran en la figura 13. Los cambios específicos para cada tratamiento fueron los siguientes: en el tratamiento con NaCl 2 M (Figura 13-a), aumentaron dos bandas de 75 y 97 kDa y disminuyeron dos bandas de 61 y 82 kDa; en el tratamiento con KCl 2 M (Figura 13-b), aumentaron dos bandas de proteína de 50 y 110 kDa y disminuyó una banda de 57 kDa; y en el tratamiento con sorbitol 2 M (Figura 13-c), aumentaron dos bandas de proteína de 95 y 119 kDa y disminuyeron cinco bandas de proteína de 48, 51, 80, 85 y 112 kDa. Los cambios similares en la expresión de proteínas para los tres tratamientos fue el aumento de una banda de 46 ± 1 kDa y la disminución de la banda de 68 ± 1 kDa. En los tratamientos con NaCl ó KCl 2 M se observó la disminución de dos bandas de proteína de 89 ± 1 y 118 ± 1 kDa, en los tratamientos con NaCl y sorbitol 2 M se observó el aumento de una banda de 56 ± 2 kDa y entre los tratamiento con KCl y sorbitol se observó similitud en el aumento de una banda de proteína de 72 ± 1 kDa. La constancia de la banda de 46 ± 1 kDa en todos los tratamientos sugiere que su expresión es una respuesta general al estrés salino y osmótico que presenta *D. hansenii* a nivel de organelos como las mitocondrias. Mientras que el aumento de la banda de 119 kDa solo en el tratamiento osmótico sugiere una respuesta específica al estrés osmótico.

Después de centrifugar a $34\ 500 \times g$ se obtuvieron dos fracciones, sobrenadante y precipitado; la primera asociada a las proteínas de citoplasma y la segunda a las proteínas de la membrana plasmática. Las gráficas de las fracciones del sobrenadante de cada tratamiento se muestran en la figura 14. En el tratamiento con NaCl 2 M (Figura 14-a) se observó el aumento específico de tres bandas de proteína de 45, 93 y 106 kDa. En el tratamiento con KCl 2 M (Figura 14-b) disminuyeron tres bandas de proteína de 47, 48 y 50 kDa. En la respuesta al tratamiento con sorbitol 2 M (Figura 14-c), se observó el aumento específico de dos bandas de proteína de 48 y 63 kDa y la disminución de una banda de 153

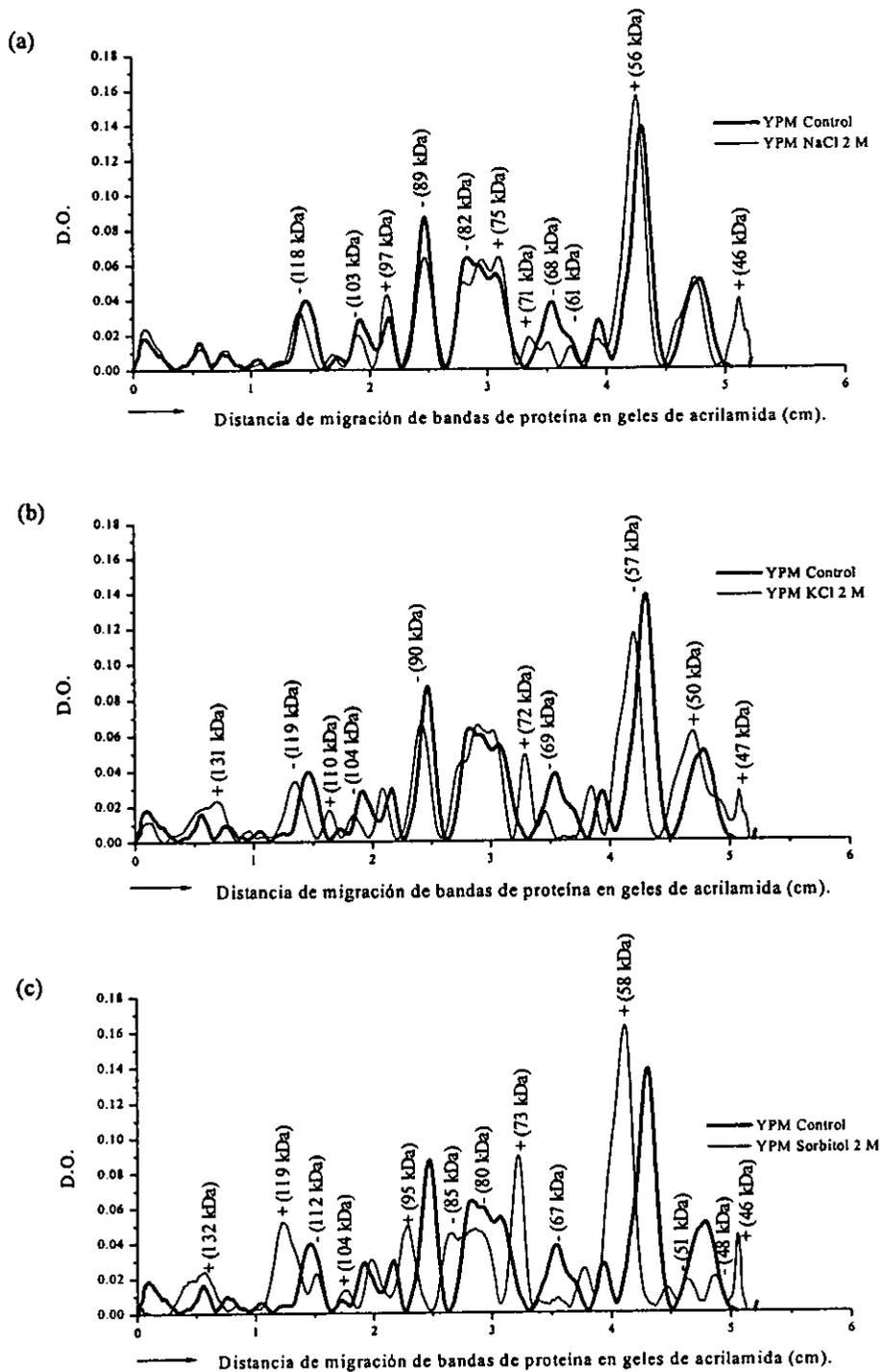


Figura 13. Patrones de bandas de proteína obtenidos mediante electroforesis y analizados por densitometría, en células de *D. hansenii* creciendo en medio YPM Fracciones del precipitado después de centrifugar a 17 000 x g. (a) NaCl 2 M, (b) KCl 2 M y (c) sorbitol 2 M. La flecha indica la dirección de la migración de las bandas de proteína en el gel durante la electroforesis. Los símbolos (+,-) señalan el aumento o la disminución de la banda de proteína con respecto al control. El peso molecular de las bandas de proteína que cambian se muestra entre paréntesis.

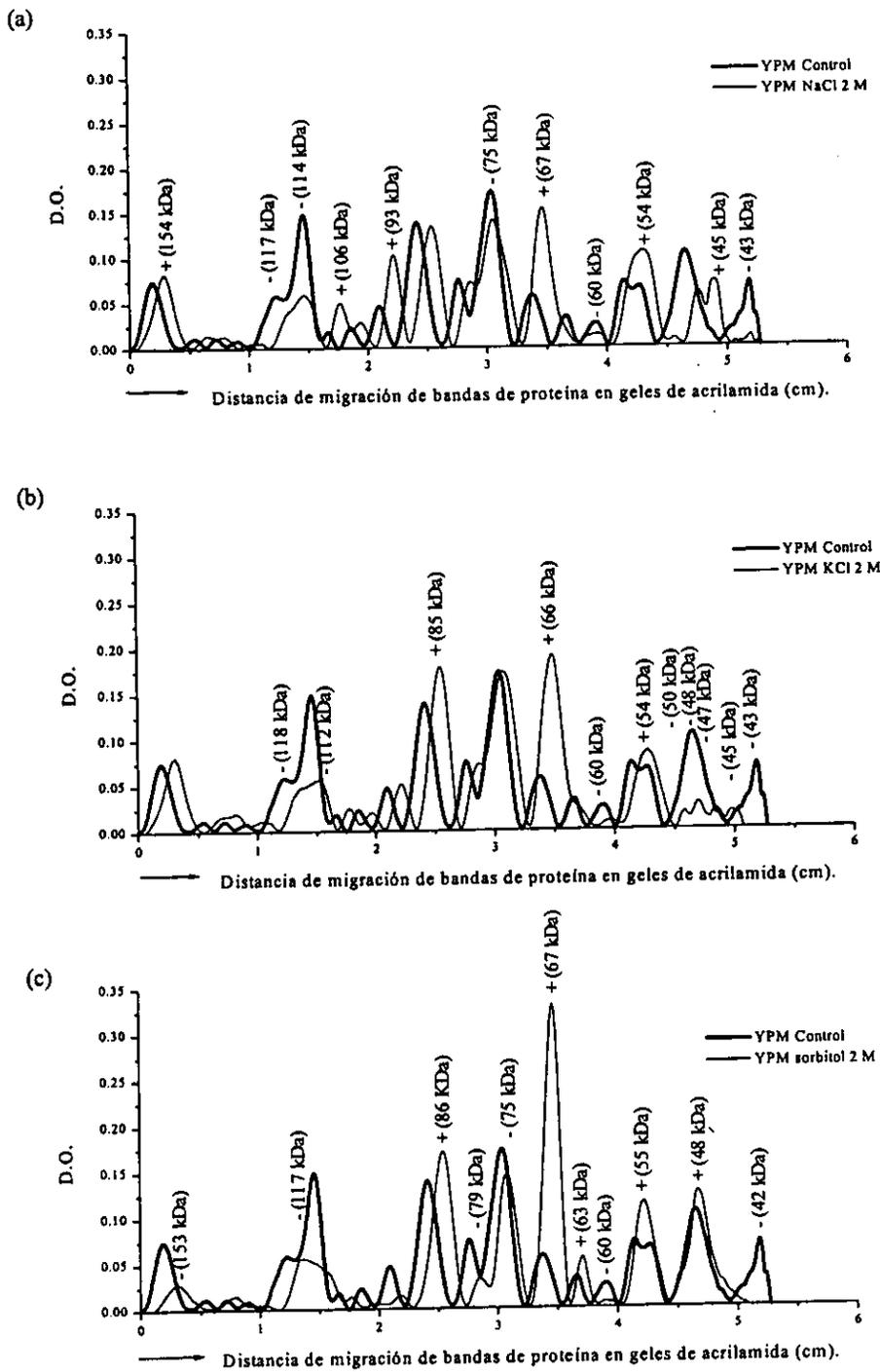


Figura 14. Patrones de bandas de proteína obtenidos mediante electroforesis y analizados por densitometría, en células de *D. hansenii* creciendo en medio YPM. Fracciones del sobrenadante después de centrifugar a 34 500 x g. (a) NaCl 2 M; (b) KCl 2 M y (c) sorbitol 2 M. La flecha indica la dirección de la migración de las bandas de proteína en el gel durante la electroforesis. Los símbolos (+,-) señalan el aumento o la disminución de la banda de proteína con respecto al control. El peso molecular de las bandas de proteína que cambian se muestra entre paréntesis.

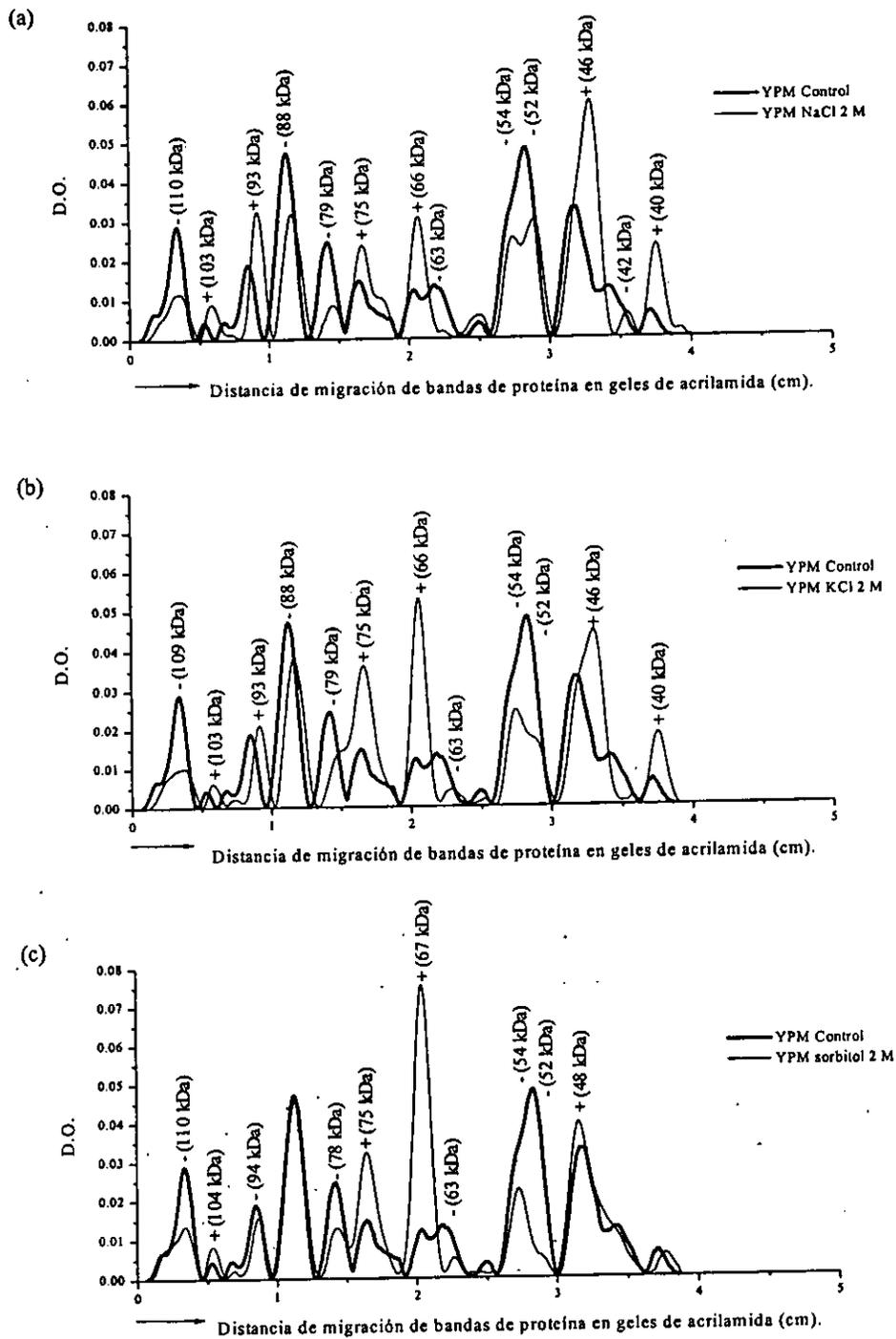


Figura 15. Patrones de bandas de proteína obtenidos mediante electroforesis y analizados por densitometría, en células de *D. hansenii* creciendo en medio YPM. Fracciones del precipitado después de centrifugar a 34 500 x g. (a) NaCl 2 M; (b) KCl 2 M y (c) sorbitol 2 M. La flecha indica la dirección de la migración de las bandas de proteína en el gel durante la electroforesis. Los símbolos (+,-) señalan el aumento o la disminución de la banda de proteína con respecto al control. El peso molecular de las bandas de proteína que cambian se muestra entre paréntesis.

kDa. Los cambios en la expresión de bandas de proteína que tuvieron similitud en los tres tratamientos fueron el aumento de dos bandas de 54 ± 1 y 66 ± 1 kDa y la disminución de tres bandas de 43, 60 y 117 ± 1 kDa. En los dos tratamientos salinos se observó el aumento de una banda de proteína de 154 kDa y entre los tratamientos con KCl y sorbitol se observó similitud en el aumento de una banda de proteína de 85 ± 1 kDa, la similitud en la expresión de ésta banda sugiere principalmente un efecto osmótico. En general las proteínas cuya expresión cambió a nivel del citoplasma confirma en la levadura *D. hansenii* la existencia de respuestas específicas y generales a condiciones de estrés salino y osmótico.

En las gráficas de las fracciones del precipitado o de las proteínas asociadas a la membrana plasmática se muestran en la figura 15. En los tratamientos con NaCl 2 M (Figura 15-a) y KCl 2 M se observó el aumento de tres bandas de proteína de proteína 40, 46 y 93 kDa y la disminución de una banda de 88 kDa. En el tratamiento con sorbitol 2 M (Figura 15-c) no se observó el aumento de cambios específicos. Por lo que respecta a la similitud en los cambios de la expresión de proteínas para los tres tratamientos en esta fracción, se observó el aumento de tres bandas de proteína de 66, 75 y 103 ± 1 kDa y la disminución de cuatro bandas de proteína de 52, 54, 79 ± 1 y 109 ± 1 kDa. En general estos cambios sugieren que *D. hansenii* expuesta a condiciones de estrés salino tiene proteínas de respuesta específica y general a nivel de la membrana plasmática.

6. DISCUSION.

Uno de los objetivos de la presente tesis fue el de determinar un protocolo de extracción de proteínas, que al ser resueltas por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de una dimensión, permitiera observar cambios en la expresión de proteínas luego de someter a células de *D. hansenii* a estrés salino u osmótico. Así mismo se propuso encontrar las mejores condiciones de estrés salino y osmótico que permitieran observar con claridad un cambio en la expresión de proteínas.

El protocolo con que se obtuvieron mejores resultados en la extracción de proteínas y visualización de cambios en la expresión de proteínas fue el protocolo II. Las ventajas mas importantes de este protocolo fueron las siguientes: Primero la utilización de maltosa como fuente de carbono en los medios de cultivo. Aunque las levaduras que fermentan como *S. cerevisiae* crecen bien en presencia de glucosa como fuente de carbono (Mattews y Webb, 1991), se ha determinado que la glucosa ejerce un efecto represivo en la actividad y/o síntesis de una variedad de enzimas del metabolismo de algunos azúcares (represión catabólica). Este efecto ocurre en el grupo de las levaduras que fermentan en condiciones de crecimiento aeróbico sobre glucosa fructosa y manosa (Gancedo y Serrano, 1989). Uno de los productos de la oxidación de la glucosa es el ATP, la concentración elevada de ATP inhibe principalmente la actividad glicolítica de enzimas como la fosfofrutoquinasa y la piruvato quinasa (Larsson *et al.*, 2000). La represión catabólica produce una disminución del metabolismo de la levadura y con esto un menor crecimiento celular. Por ello se recomienda hacer ensayos con diferentes fuentes de carbono para determinar las condiciones optimas de crecimiento de la levadura de interés (Brown y Tuite, 1998). En el presente trabajo se estableció que la utilización de maltosa en los medios de cultivo mejoró sustancialmente la observación de cambios en la expresión de proteínas. *D. hansenii* levadura que respira ha sido reportada como una levadura capaz de asimilar maltosa (Kreger-van Rij, 1984; Prillinger *et al.*, 1999) y Thomé-Ortiz (1995) observó que la maltosa utilizada como fuente de carbono favorece el crecimiento de *D. hansenii*.

Segundo el aumento de la concentración de NaCl de 1M hasta 2M. En el trabajo de Neves *et al.* (1997) sobre el crecimiento de *D. hansenii* en presencia de NaCl 1 M, se reportó que a esta concentración de Na⁺ los parámetros de crecimiento no se vieron

afectados, ya que la velocidad máxima de crecimiento, la duración de la fase de retardo y la biomasa no presentaron variaciones importantes con respecto al control; mientras que *D. hansenii* expuesta a NaCl 2 M, presentó cambios importantes en la velocidad máxima de crecimiento la que disminuyó, así como la duración de la fase de retardo que aumentó y la menor biomasa con respecto al control, en el presente trabajo la mayor sensibilidad de *D. hansenii* a una concentración 2 M de Na⁺ se observó en el aumento de los cambios en la expresión de proteínas de respuesta al estrés salino.

El rompimiento celular con perlas de vidrio, que se llevó a cabo en un menor tiempo si se compara con la duración del rompimiento en la prensa de French, este último se considera como una desventaja si se tienen que procesar varias muestras, en particular cuando en la mayoría de los casos las muestras se pasaron tres veces por la prensa y es necesario evitar la degradación de proteínas (Catley, 1988; Beynon, 1989; Tuite y Oliver, 1991).

El análisis de proteínas mediante la electroforesis con el método de Shagger y von Jagow, por otro lado mejoró la resolución y definición de bandas de proteína con pesos moleculares entre 30 a 100 kDa en comparación al método de Laemmli con el cuál se obtuvo una mejor resolución de bandas de proteína de peso molecular elevado o mayores a 100 kDa, lo cual representó una desventaja debido a que se necesitaba determinar el mayor número de cambios en la expresión de proteínas y no solo las de peso molecular elevado.

En la evaluación del choque salino (NaCl 1 M) y del térmico (35° C por 45 min) así como del efecto combinado de ambos en presencia de dos fuentes de carbono distintas, se encontró de forma general que en presencia de glucosa no hay cambios significativos en la expresión de proteínas en los tres tratamientos mientras que en presencia de galactosa hay cambios significativos tanto en la concentración aparente de proteínas, como en el número de las que presentan dichos cambios.

A pesar de que los cambios en la expresión de proteínas fueron menores en presencia de glucosa se observó que hay una diferencia entre las proteínas de respuesta a choque salino y a choque térmico.

Los cambios en la expresión de bandas de proteína que se observaron en el choque salino, fueron también evidentes en el tratamiento del efecto combinado (bandas con pesos

aproximados de 40, 47, 49 y 112 kDa), mientras que solamente una banda de 78 kDa fue observada en común en los tratamientos de choque térmico y del efecto combinado. Estos resultados sugieren que *D. hansenii* creciendo en un medio con glucosa como fuente de carbono y expuesta simultáneamente a un choque salino y térmico, es más sensible al efecto del NaCl que al efecto térmico.

Por otro lado cuando se utilizó galactosa como fuente de carbono se encontró que los cambios en la expresión de proteínas con choque salino o térmico inducen en ambos casos dos proteínas de 39 ± 1 y 54 ± 1 kDa, que podrían ser consideradas proteínas de respuesta general a choque salino y térmico, aunque se observa mayor similitud en el cambio de la banda de 39 ± 1 kDa en los tratamientos del choque salino y el efecto combinado. Aunado a ello la banda de proteína de 54 ± 1 kDa no se observa en el tratamiento del efecto combinado por lo que se descarta la posibilidad de que ambas proteínas son proteínas de respuesta general, probablemente la banda de proteína de 39 ± 1 kDa es más específica para choque salino y podría representar a la enzima osmo-inducible glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, con un peso molecular reportado de 43 kDa (Nilsson y Adler, 1990). En presencia de galactosa, el tratamiento de choque térmico mostró un mayor número de cambios en las bandas de proteína; en particular las bandas de 52 y 57 kDa que disminuyeron apreciablemente también fueron aparentes en el tratamiento del efecto combinado, por lo que podrían considerarse como proteínas de respuesta específica a choque térmico. Otras bandas de proteína que no se apreciaron en el efecto combinado, pero cuya variación si se observó en el tratamiento de choque térmico fueron las bandas de pesos aproximados de 65, 78 y 82 kDa, que podrían haber aumentado su expresión relativa en el tratamiento del efecto combinado, debido probablemente a la mayor susceptibilidad de *D. hansenii* al estrés salino que al térmico.

La observación más importante al utilizar las dos fuentes de carbono fue la consistencia en el aumento de la banda de 78 kDa en los tratamientos del choque térmico, por lo que se considera que esta proteína es una proteína específica de respuesta a choque térmico. En estudios previos realizados en *S. cerevisiae*, se determinó que si bien no existe una correlación fisiológica entre los dos tipos de estrés, existen sin embargo proteínas que son inducidas por ambos (proteínas conocidas como de choque térmico) y que pueden proteger a las células incrementando su tolerancia al ser expuestas a un segundo estrés

(Trollmo *et al.*, 1998; Varela *et al.*, 1992). Mas recientemente Lewis *et al.* (1995) postularon que existe una relación de protección cruzada, demostrando que un estrés térmico puede dar cierta protección a las células sometidas posteriormente a un estrés salino y viceversa, ya que en ambos casos se induce la acumulación de un metabolismo protector, aunque este metabolismo es específico: trehalosa en un caso (termo-protector) y glicerol en el otro (osmo-protector). Probablemente en *D. hansenii* exista una protección cruzada similar, con proteínas específicas para cada tipo de estrés, además de una serie de proteínas en común. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos, las proteínas comunes a estrés térmico y salino representan un conjunto mas pequeño, lo que podría sugerir que en *D. hansenii* la respuesta a los dos tipos de estrés es mas específica.

En la síntesis de proteínas en presencia de choque salino (NaCl 1.5 M) y estrés salino constante (NaCl 1.5 M) mediante el marcaje radioactivo con metionina [³⁵S]. En ambos experimentos se encontró un número reducido de bandas de proteína con un cambio significativo y se sugirió que esto era debido a dos eventos posibles: La concentración de metionina marcada no fue suficiente para asegurar su incorporación en todas las proteínas que se sintetizaron después del choque salino; o bien *D. hansenii* expuesta a las condiciones de choque salino empleadas, no necesita sintetizar un gran número de proteínas para contrarrestar los efectos de un choque salino. Considerando que en el marcaje de proteínas la concentración recomendada de metionina [³⁵S] es de 15 a 200 $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ de cultivo (Nicolet y Craig, 1991; Tuite y Oliver, 1991; Pollard, 1996), y que ésta depende del organismo y las condiciones del cultivo, las condiciones experimentales empleadas en el presente trabajo para el marcaje de proteínas se realizaron en condiciones subóptimas, los resultados obtenidos permiten ilustrar la marcada diferencia que existe en el patrón de expresión de las bandas de proteína en dos condiciones experimentales tan contrastantes para la célula, es decir, la adaptación a un choque salino, por un lado y el ajuste celular en el crecimiento en condiciones de salinidad elevada constante. Esto se aprecia claramente en los resultados evaluados por densitometría respectivos.

En los resultados que se obtuvieron en presencia del estrés salino (NaCl y KCl 2 M) y osmótico (sorbitol 2 M) constantes, se encontraron diferencias menores en la expresión de bandas de proteínas en los tratamientos del estrés salino, como las bandas de proteína de

35, 66 y 113 kDa, la primera aumentó en presencia de NaCl 2 M, la segunda desapareció y la tercera aumentó, ambas en presencia de KCl 2 M. Estos resultados sugieren que *D. hansenii* tiene una respuesta similar a Na⁺ y K⁺ en las condiciones empleadas.

Entre los tratamientos del estrés salino y osmótico se encontró una diferencia mayor en los cambios de la expresión de bandas de proteína, en el tratamiento con sorbitol 2 M, aumentaron específicamente dos bandas de proteína (33 y 66 kDa). No se puede reconocer un patrón definido en el aumento de bandas de proteína que sugiera que las proteínas de respuesta al estrés salino son iguales a las de respuesta al estrés osmótico. En cuanto a la disminución de las bandas de proteína en los tres tratamientos se encontró que las bandas de proteína en el tratamiento con sorbitol 2 M son diferentes a las bandas que disminuyeron en los tratamientos con NaCl y KCl 2 M. Por lo que se sugirió que *D. hansenii* incrementa o disminuye proteínas de forma muy diferente cuando el estrés es salino u osmótico. En la literatura no existen evaluaciones de proteínas asociadas a la respuesta de osmo-regulación en condiciones que contrasten un estrés salino con un estrés osmótico, aunque si hay estudios fisiológicos en los que se ha sugerido que la respuesta a un estrés salino es cualitativamente diferente de la respuesta a un estrés osmótico, ya que un estrés salino esta además acompañado por un efecto tóxico del sodio sobre el metabolismo celular (Serrano, 1996).

Con el fraccionamiento celular de proteínas por centrifugación se encontró en la fracción de proteínas de la mitocondria en los tratamientos del estrés salino y osmótico constantes la presencia de una banda de proteína no presente en el control de 46 ± 1 kDa; en los tratamientos con KCl ó sorbitol 2 M aparece una banda de 73 ± 1 kDa y en el tratamiento con sorbitol 2 M aumenta la expresión de una banda de 119 kDa. Dada la importancia de la mitocondria en los eucariontes como uno de los principales generadores de ATP y en el transporte activo de compuestos solubles o iones (Kocková-Kratochvílova, 1990), es probable que las proteínas de 46 ± 1 , 73 ± 1 y 119 kDa sean importantes en el transporte de iones.

En la fracción de proteínas del citoplasma se encontró en el tratamiento con NaCl 2 M el aumento de una banda de 93 kDa, en el tratamiento con KCl 2 M aumentó una banda de 85 kDa y en el tratamiento con sorbitol 2 M aumentó una banda de proteína de 55 kDa.

El aumento de las bandas de 55, 85 y 93 kDa sólo en condiciones del estrés osmótico o salino constantes podrían considerarse como una respuesta específica al estrés por sorbitol, K^+ y Na^+ respectivamente. El citoplasma se caracteriza por la presencia de microsomas y perioxomas (Kocková-Kratochvílova, 1990), los microsomas están asociados principalmente al Retículo endoplásmico (Lambert, 1989), que es el sitio de síntesis de péptidos y proteínas que luego serán enviados a los diferentes organelos celulares. De ahí que la presencia de las bandas de proteína de 55, 85 y 93 kDa en la fracción de proteínas del citoplasma es importante porque probablemente son indispensables en la síntesis de otras proteínas que son requeridas en condiciones de un estrés salino u osmótico.

En la fracción de proteínas de membrana plasmática, se encontró que dos bandas de proteína de 66 ± 1 y 75 kDa aumentaron en los tratamientos del estrés salino y osmótico constantes, probablemente el aumento en la expresión de éstas proteínas sea una respuesta general al estrés osmótico. Dos bandas de 46 y 40 kDa aumentaron en los tratamientos del estrés salino, se considera que éstas dos bandas de proteína son una respuesta específica al estrés con Na^+ y K^+ . Todos los organelos celulares son importantes, sin embargo uno de los organelos cuya función es indispensable para la osmo-regulación es la membrana plasmática, debido a que en ésta se lleva a cabo el transporte de compuestos orgánicos y de iones hacia el interior o el exterior de la célula (Kocková-Kratochvílova, 1990). En los trabajos sobre transporte de Na^+ en *D. hansenii* se sugiere que esta levadura tiene un sistema de difusión facilitada (Thomé-Ortiz *et al.*, 1998), aún no se ha determinado si el sistema esta presente a nivel de la membrana plasmática, pero el aumento de las bandas de proteína antes mencionadas podría estar relacionado con este sistema de difusión facilitada.

Aunque no es válida la correlación de datos entre los apartados descritos en la sección de resultados, debido a la diferencia en las condiciones de los tratamientos evaluados, se pueden observar y señalar las similitudes entre algunos de los datos obtenidos en cada apartado.

En los experimentos de choque salino se encontró el aumento de una banda de 39 kDa que posiblemente corresponde a la banda de 40 kDa que aumentó en presencia de galactosa en el tratamiento del efecto combinado de choque salino y térmico, que a su vez coincide con el peso molecular de una banda de proteína de 40 kDa que aumento en

presencia del estrés salino constante (NaCl y KCl 2 M) en las fracciones de proteínas asociadas a la membrana plasmática. La similitud en el aumento de esta banda de proteína, podría indicar que esta proteína es una respuesta específica a cualquier tipo de estrés salino. El aumento de la banda de proteína de 40 kDa, podría ser similar a la proteína de 40 kDa reportada para *Zygosaccharomyces rouxii* en condiciones de choque salino con NaCl 1 M (Yagi y Nishi, 1993).

En el tratamiento con choque salino (NaCl 1M) en la fracción del sobrenadante obtenida mediante el corte de sulfato de amonio y en los tratamientos del estrés salino (NaCl 2 M) y osmótico (sorbitol 2 M) constantes se observó el aumento de una banda de proteína de 57 ± 1 kDa; mientras que en el tratamiento con choque térmico y del efecto combinado ésta disminuyó. La coincidencia en el aumento de ésta banda solo en presencia de Na^+ y sorbitol, sugiere que es indispensable durante condiciones generales de estrés osmótico.

En los tratamientos de choque salino, estrés salino u osmótico constantes, se observó el aumento significativo de una banda de proteína de 67 ± 1 kDa, que podría ser muy similar a una banda de proteína de 65 kDa observada en presencia de choque térmico, es probable que esta proteína sea una respuesta general de estrés, esto es acorde a los resultados reportados por Varela *et al.* (1992), quienes evaluaron los efectos del choque salino, osmótico y térmico sobre la inducción de síntesis de proteínas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y encontraron que solo dos proteínas se sobre expresan en choque salino y térmico.

En el presente trabajo se considera que la proteína de 67 ± 1 kDa que se observó en los tratamientos de estrés salino y osmótico, coincide con el peso molecular de la proteína Ssb20 de *S. cerevisiae* Craig (1992), codificada por el gen *SSB2* (familia de genes *HSP70*) solo que en *S. cerevisiae* Ssb2p disminuye después de un choque térmico. Otra posibilidad es la que menciona Craig (1992): como el gen *ST11* de *S. cerevisiae* que codifica una proteína de 66 kDa de la cual se desconoce su función durante choque térmico, sólo se ha sugerido su participación conjunta con proteínas Hsp70 en el movimiento de proteínas a través de membranas o en el plegamiento de proteínas.

Se encontró una mayor diferencia en la expresión de bandas de proteína entre choque y estrés salino constante, esto sugiere que *D. hansenii* tiene dos respuestas

específicas a estrés por Na^+ : una al choque salino, en la que *D. hansenii* induce ciertas proteínas con las cuales puede contrarrestar inmediatamente los efectos de un cambio repentino de la salinidad en el medio, y que después de un período de adaptación esas proteínas ya no son necesarias. Y sea justo luego de este período de adaptación en el que *D. hansenii* induce otras proteínas que le permiten crecer en la presencia continua de Na^+ . Este cambio en la expresión de proteínas de respuesta a un choque salino ó a un estrés salino constante también se observa claramente en los resultados que se obtuvieron con el marcaje de metionina.

La comparación de los pesos moleculares entre las bandas de proteína que cambian su expresión en los tratamientos antes señalados y las proteínas reportadas para *S. cerevisiae* y *Z. rouxii*, creciendo en condiciones de estrés osmótico y/o térmico, permitió encontrar sólo algunos valores de peso molecular similares. Sin embargo, se puede establecer que hay una similitud en la expresión de proteínas específicas para cada tipo de estrés, y al igual que en *S. cerevisiae* tampoco en *D. hansenii* se puede proponer la existencia de una respuesta general al estrés. La propuesta anterior concuerda con los resultados encontrados por Hirayama *et al.* (1995).

Un efecto importante de estrés por sal es el número de proteínas que disminuyen su concentración. El trabajo de Blomberg (1995) es uno de los pocos donde se menciona la disminución de proteínas, este autor reportó seis proteínas que disminuyeron de 1/10 a 1/6 su expresión con respecto al control, en *S. cerevisiae* expuesta a NaCl 0.7 M. En los tratamientos del estrés salino se encontró la disminución de una banda de proteína de 52 ± 1 kDa, el peso molecular y la expresión de esta banda de proteína coincide con uno los reportados por Blomberg (1995).

De forma general, si sólo se consideran aquellas bandas de proteína que disminuyen su expresión en cualquiera de los tratamientos, se observa que el número de proteínas es variable así como el peso molecular, por lo que no sería posible establecer una relación que pueda definir un comportamiento específico. Sin embargo fueron apreciables en presencia del choque térmico, la disminución de una banda de 57 kDa, ésta disminución podría considerarse como una respuesta específica a un cambio de temperatura; en presencia del choque salino, del estrés salino y del osmótico constantes, fue importante la disminución de

dos bandas de 42 ± 1 y 79 ± 1 kDa, probablemente este cambio es una respuesta general al estrés salino y osmótico; en el tratamiento de choque salino la disminución de una banda de proteína de 61 kDa, se considera como una respuesta específica a choque salino, el peso molecular de esta banda de proteína coincide con el de una banda de proteína que también disminuye en *S. cerevisiae* en condiciones de choque salino (Yagi y Nishi, 1993). En la fracción de las proteínas de las mitocondrias en los tratamientos del estrés salino u osmótico constantes, disminuyó una banda de 109 ± 1 kDa, que podría estar relacionada con algunas de las enzimas que participan en la respiración, la disminución de la banda de 109 ± 1 kDa podría relacionarse con los resultados de Neves *et al.* (1997), estos autores reportaron una disminución en la velocidad de la respiración en *D. hansenii* a partir de una concentración de 0.9 M de Na^+ ó K^+ . En los tratamientos del estrés salino u osmótico constantes disminuyeron tres bandas de proteína de 112, 114 y 117 ± 1 kDa asociadas a las proteínas de citoplasma, la disminución de éstas bandas de proteína podría correlacionarse con la represión de las proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa y en la producción de etanol reportadas para *S. cerevisiae* (Norbeck y Blomberg, 2000) durante crecimiento bajo condiciones de estrés salino.

En trabajos posteriores sería de importancia realizar nuevamente los experimentos donde se utilizó glucosa y galactosa como fuentes de carbono en los tratamientos por choque salino ó térmico y del efecto combinado de ambos, pero incrementando la concentración de NaCl a 2 M y el valor de la temperatura a 37 °C, para determinar si los cambios en la expresión de proteínas aumentan o son similares a los que se encontraron en el presente trabajo. También sería interesante cuantificar el glicerol intracelular en *D. hansenii* por intervalos de tiempo en el experimento del efecto combinado de un choque salino y térmico, ya que si bien se ha reportado que el glicerol es el principal osmolito que produce *D. hansenii* en condiciones de choque salino, sin embargo no se ha reportado cual sería su papel fisiológico en un efecto combinado como el empleado en este trabajo.

Así mismo es indispensable hacer una evaluación de la expresión de proteínas en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas, en los tratamientos del estrés por sales, temperatura y un soluto del estrés osmótico, para determinar que bandas de proteína corresponden a proteínas que se sintetizan de *novo* en las condiciones de los tratamientos

antes mencionados.

Los cambios mas marcados que se observaron en diversas bandas de proteína en el presente trabajo indican que la respuesta osmo-regulatoria en *D. hansenii*, ocurre en varios organelos celulares. Para tener una información más completa sobre la posible función celular de estas bandas proteicas, sería necesario lograr el aislamiento de las proteínas, obtener la secuencia parcial de sus aminoácidos, y compararla contra bancos de secuencias de proteínas extraídas de organismos eucariontes, con función conocida, a fin de estar en posibilidades de sugerir una función para estas proteínas, en la respuesta celular al estrés salino u osmótico.

7. CONCLUSIONES.

- El aumento en la expresión de las bandas de proteína de 39 y 40 kDa, sólo en las condiciones del choque y del estrés salino evaluadas, encontradas en la fracción de proteínas de la membrana plasmática, muy probablemente corresponde a una respuesta específica al estrés salino.
- La banda de proteína de 78 kDa cuya expresión aumentó en los tratamientos de choque térmico se considera como una proteína de respuesta específica a un incremento en la temperatura.
- Las bandas de proteínas de 54 y 55 kDa, que aumentaron en condiciones de choque salino, choque térmico y estrés salino constante, enriquecidas en la fracción de proteínas de citoplasma, podrían ser consideradas como proteínas de respuesta general a estrés.
- Las bandas de 72 y 73 kDa que aumentaron en las condiciones del estrés salino y osmótico constante, encontradas en la fracción de las proteínas de la mitocondria se consideran proteínas de respuesta general al estrés osmótico.
- Las bandas de 85 y 93 kDa que aumentaron específicamente, la primera en el tratamiento del estrés salino con Na^+ y la segunda en presencia de K^+ , ambas asociadas a la fracción de proteínas del citoplasma se consideran como proteínas de respuesta específica al estrés iónico.
- La banda de 119 kDa cuya expresión aumentó solo en presencia de sorbitol y que fue enriquecida en la fracción de las proteínas de la mitocondria muy probablemente sea una proteína de respuesta específica al estrés osmótico.
- Las bandas de 46 y 47 kDa cuya expresión aumento en presencia del choque y del estrés salino u osmótico, encontradas en la fracción de las proteínas de la membrana plasmática

podrían estar asociadas a sistemas de transporte de iones o compuestos orgánicos en condiciones de estrés osmótico general.

- Las bandas de proteínas de 66 y 67 kDa, que aumentaron en choque salino y estrés salino u osmótico constante, la primera enriquecida sólo en la fracción de proteínas de membrana plasmática y la segunda asociada tanto a la fracción de proteínas de citoplasma como a las proteínas de membrana plasmática, probablemente son una respuesta específica de *D. hansenii* sometida a estrés salino y osmótico.

- La banda de proteína de 57 kDa que disminuyó en el tratamiento de choque térmico se considera como una proteína termo-responsiva.

- Las bandas de 42, 43 y 81 kDa que disminuyeron en los tratamientos de choque salino, estrés salino y del estrés osmótico, probablemente son proteínas de respuesta general al estrés salino y osmótico.

- La disminución en la expresión de una banda de 109 ± 1 kDa en los tratamientos del estrés salino u osmótico constante, asociadas a la fracción de las proteínas de las mitocondrias, es una respuesta general a cualquier tipo de estrés osmótico.

- Las bandas de 112, 114 y 117 kDa, que disminuyeron su expresión en presencia de estrés salino u osmótico constante, encontradas en la fracción de proteínas del citoplasma, en *D. hansenii* podrían ser consideradas como proteínas del metabolismo de la glucosa que sufren represión, como las proteínas reportadas para *S. cerevisiae* por Norbeck y Blomberg (2000).

- Se considera que *D. hansenii* no presenta un conjunto de proteínas de respuesta general a estrés.

8. BIBLIOGRAFIA

- Adler L., Blomberg A. y Nilsson A. (1985). Glicerol metabolism in the salt tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J Bacteriol* **162**, 300-306.
- André L., Nilsson A. y Adler L. (1988). The role of glicerol of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *J Gen Microbiol* **134**, 669-677.
- André L., Hemming A. y Adler L. (1991). Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol 3-phosphate Dehydrogenase (NAD⁺). *FEBS* **286(1,2)**, 13-17.
- Avron M. (1986). The osmotic components of halotolerant algae. *TIBS* **11**, 5-6.
- Bansal P.K. y Mondal A. K. (2000). Isolation and sequence of the HOG1 homologue from *Debaryomyces hansenii* by complementation of the *hog1* Delta strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16(1)**, 81-88.
- Beynon R. J. Identification of proteolysis as a problem, en *Protein Purification Methods a Practical Approach*. Harris E. L. V. y Angal S. Eds. IRL Press. New York, 1989, 42-43.
- Blomberg A. y Adler L. (1992). Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv Microbial Physiol* **33**, 145-212.
- Blomberg A. (1995). Global Changes in protein synthesis during adaptation of the yeast *Sachharomyces cerevisiae* to 0.7 M NaCl. *J Bacteriol* **177**, 3563-3572.
- Blomberg A. (1997). Osmoresponsive proteins and functional assessment strategies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Electrophoresis* **18**, 1429-1440.
- Brown A. J. P. y Tuite Mick F. Yeast growth, en *Methods in microbiology*. Vol 26. Academic Press. San Diego. 1998, 471-477.
- Burke R. M. y Jennings D. H. (1990). Effect of sodium chloride on growth characteristics of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* in batch and continuous culture under carbon and potassium limitation. *Mycol. Res.* **94(3)**, 378-388.
- Catley B. J. Isolation and analysis of cell walls, en *Yeast A practical approach*. Campbell I. y Duffus J. H. Eds. IRL Press, Washington D.C. 1988, 163-164.
- Craig E. A. The Heat-shock Response of *Saccharomyces cerevisiae*, en *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression*. Jones E. W., Pringle J. R. y Broach J. R. Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1992, 501-537.

- Csonka L.N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological reviews* **53**(1), 121-147.
- Fiechter A., Käppeli O. y Meusdoerffer F. Batch and Continuous Culture, en *The Yeasts*. Vol. 2, Rose A. H. y Harrison J. S. Eds., Academic Press, London. 1987, 99-127.
- Fyhn H. J., Finn R. N., Reith M., Norberg B. (1999). Yolk protein hydrolysis and oocyte free amino acids as key features in the adaptive evolution of teleost fishes to seawater. *Sarsia* **84**(5-6), 451-456.
- Fukuda K., Mebuchi M., Takata H. y Gunge N. (1997). The linear plasmid pDHL1 from *Debaryomyces hansenii* encodes a protein highly homologous to the pGKL1 plasmid DNA polymerase. *Yeast* **13**(7), 613-620.
- Gaciadeblas B., Rubio F., Quintero F.J., Bañuelos M.A., Haro R. y Rodríguez-Navarro A. (1993). Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **236**, 363
- Gunge N., Fukuda K., Morikawa S., Murakami K., Takeda M. y Miwa A. (1993). Osmophilic linear plasmids from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Current Genetics* **23**(5-6), 443-449.
- Gupta R. (1996). Growth of marine yeast on different strenght of stress solutes. *Proc. Second Workshop Scient. Resul. FORV* 91-95.
- Gustafsson L. y Norkrans B. (1976). On the Mechanism of Salt Tolerance. Production of Glycerol and Heat during Growth of *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiol.* **110**, 177-183.
- Harold F. M. (1986). The vital force: a study of bioenergetics. W. H. Freeman, Eds. Co. New York. pp 332-350.
- Haro R., Gaciadeblas B. y Rodríguez-Navarro A. (1991). A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett* **291**, 189-191.
- Hernández-Saavedra N.Y., Ochoa J.L. y Vazquez-Duhalt. (1995). Osmotic adjustment in marine yeast. *J Plankton Research* **17**,59-59.
- Hirayama T., Maeda H. S. y Shinozaki K. (1995). Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **249**, 127-138.
- Hobot J.A. y Jennings D. H. (1981). Growth of *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to pH and salinity. *Experimental Mycology* **5**, 217-228.
- Jazwinski S. M. Preparation of Extracts from Yeast, en *Methods in Enzymology*. Vol 182,

- Guide to Protein Purification. Deutscher M. P. Ed. Academic Press. San Diego. 1990, 154-174.
- Kirst G. O. (1990). Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 21-53.
- Kocková-Kratochvílová A. (1990). Yeast and Yeast-like organisms. VCH Verlagsgesellschaft, New York. 77-130.
- Krayushkina L.S. (1998). Osmoregulation in Acipenseridae: a comparison of freshwater, brackishwater and seawater sturgeons. The Society for Experimental Biology Annual Meeting. Physiological adaptations of osmoregulatory organs. SEB and Springer 1998.
- Lambert N. Isolation of microsomes, en Protein Purification Methods a Practical Approach. Harris E. L. V. y Angal S. Eds. IRL Press. New York, 1989, 101-102.
- Laemmli U. K. (1970). Clavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Larsson C., Morales C., Gustafsson L. y Adler L. (1990). Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *J Bacteriol* **172**, 1769-1774.
- Larsson C. y Gustafsson L. (1993). The role of physiological state in osmotolerance of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Can J Microbiol* **39**, 603-609.
- Lewis J. G., Learmonth R. P. y Watson K. (1995). Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **141**, 687-694.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., y Randall R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenal reagent. *Biol Chem* **193**, 265-275.
- Lucas C., Da Costa M., y Van Uden N. (1990) Osmoregulatory active sodium-glycerol co-transport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **6**, 187-191.
- Mager W. H. y Varela J. C. S. (1993). Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. *Molecular Microbiology* **10(2)**, 253-258.
- Matthews T. M. y Webb C. Culture Systems, en Biotechnology Handbooks Vol. 4 Saccharomyces. Tuite M. F. y Oliver S. G. Eds. Plenum Press, New York. 1991, 250-256.
- Neves M. L., Oliveira R.P. y Lucas C. M. (1997). Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiol* **143**, 1133-1139.

- Nicolet C. M. y Craig E. A. Inducing and Assaying Heat-Shock Response in *Saccharomyces cerevisiae*, en *Methods in Enzymology* Vol 194. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Guthrie C. y Fink G. R. Eds. Academic Press. San Diego. 1991, 710-714.
- Nilsson A. y Adler A. (1990). Purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1034, 180-185.
- Norbeck J. y Blomberg A. (2000). The level of cAMP-dependent protein kinase A activity strongly affects osmotolerance and osmo-instigated gene expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16, 121-137.
- Norkrans B. (1966). Studies on marine occurring yeasts: growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Arch Microbiol* 54, 374-392.
- Norkrans B. (1968). Studies on marine occurring yeasts: respiration, fermentation and salt tolerance. *Arch Microbiol* 62, 358-372.
- Norkrans B. y Kylin A. (1969). Regulation of the potassium to sodium ratio and the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeast. *J Bacteriol* 100, 863-845.
- Prillinger H., Molnar O., Lechner F. E. y Lopandic K. (1999). Phenotypic and Genotypic Identification of yeasts from cheese. *Antonie van Leeuwenhoek* 75, 267-283.
- Pollard J. W. Radioisotopic Labeling of Proteins for Polyacrylamide Gel Electrophoresis En The Protein Protocols Handbook. Walker J. M. Ed. Humana Press. New Jersey. 1996, 121-126.
- Prista C., Almagro A., Loureiro-Dias M.C. y Ramos J. (1997). Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl Environ Microbiol* 63, 4005-4009.
- Ramírez J., Ramírez O., Saldaña C., Coria R. y Peña A. (1998). A *Saccharomyces cerevisiae* Mutant Lacking a K⁺/H⁺ Exchanger. *Journal of Bacteriology* 180(22), 5860-5865.
- Rodriguez-Navarro A., Blatt M. R. y Slayman C. L. (1986). A Potassium-Proton Sympor in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Physiol.* 87, 649-674.
- Rosen B. P. ATP-Coupled Solute Transport Systems, en *Escherichia coli and Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. Vol 1. Neidhardt F.C., Ingrahm J. L., Low K. B., Magasanik K. B., Schaechter M. y H. E. Umbarger Eds. American Society for Microbiology, Washington D.C. 1987, 761-762.
- Santoro M.M., Liu Y., Khan S. MA., Hou Li-Xiang y Bolen D.W. (1992). Increased thermal stability of Proteins in the presence of naturally occurring osmolytes.

American Chemical Society 31, 2578-2583.

- Serrano R. (1996). Salt Tolerance in Plants and Microorganisms: Toxicity Targets and Defense Responses. *International Review of Cytology* 165, 1-52.
- Schägger H. y von Jagow G. (1987). Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166, 368-379.
- Stoscheck C. M. Quantitation of Protein, en *Methods in Enzymology*. Vol 182, Guide to Protein Purification. Deutscher M. P. Ed. Academic Press. San Diego. 1990, 154-174.
- The yeasts: a taxonomic study. Kreger-van Rij N. J. W. Ed. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. 1984, 130-145.
- Thewissen J. G. M., Roe L. J., O'Neil J. R., Hussain J. R., Hussain S., Sahni A., Bajpai S. (1996). Evolution of cetacean osmoregulation. *Nature* 381(6581), 379-380.
- Thomé P.E. (1995). Induction of Glicerol-3-Phosphate Dehydrogenase in the Euryhaline Yeast *Debaryomyces hansenii*, by NaCl-Mediated Osmotic Stress. Ph. D. Dissertation. University of California Santa Barbara.
- Thomé-Ortiz P.E., Peña A. y Ramírez J. (1998). Monovalent cation fluxes and Physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentration of KCl and NaCl. *Yeast* 14, 1355-1371.
- Thomé P.E. y Trench R. K. (1999). Osmoregulation and the genetic induction of glycerol -3-phosphate dehydrogenase in the euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii*. *Marine Biotechnology* 1, 230-238.
- Trollmo C., André L., Blomberg A. y Adler L. (1988). Physiological overlap Between Osmotolerance and thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* 56, 321-326.
- Tuite M. F. y Oliver S. G. Biochemical Techniques, en *Biotechnology Handbooks* Vol. 4 *Saccharomyces*. Tuite M. F. y Oliver S. G. Eds. Plenum Press, New York. 1991, 250-256.
- Varela J.C.S., van Beekvelt C., Planta R.J. y Mager W.H. (1992). Osmostress-induced changes in yeast gene expression. *Molecular Microbiology* 6, 2183-2190.
- Warne J. M. (1998). Neurohypophysial peptide receptors in the flounder. The Society for Experimental Biology Annual Meeting. Physiological adaptations of osmoregulatory organs. SEB and Springer 1998.

- Wiggins P. M. (1990). Role of water in some biological processes. *Microbiological Reviews* 54 (4), 432-449.
- Yagi T. y Nishi T. (1993). Regulation of intracellular osmotic pressure and changes in Intracellular proteins during the initial stages of salt stress in *Zygosaccharomyces* Strains exhibiting differences in salt-tolerance. *Microbios* 74, 155-166.
- 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.
- Yancey P. H. Compatible and Counteracting Solutes, en Cellular and Molecular Physiology of cell volume regulation. K. Strange Eds., CRC Press, Florida. 1994, 81-109.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**