



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Obtención de una mutante carente de la MAP cinasa *HOG1* en *Debaryomyces hansenii* y su participación en la tolerancia al estrés hipersalino y a otros tipos de estrés”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

NORMA SILVIA SÁNCHEZ SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL:

DR. ANTONIO PEÑA DÍAZ

[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. ROBERTO CORIA ORTEGA

[Instituto de Fisiología Celular](#)

DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ

[Facultad de Medicina](#)

Ciudad de México, agosto 2021



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.

## **DEDICATORIA:**

A mis adorados hijos Andrés y Ana Paulina quienes cambiaron mi sentido por la vida, por todo el apoyo y amor que recibo día a día.  
Este logro es de ustedes también. Los amo con todo mi corazón.

A mi abuelita Graciela Ríos quien es una segunda madre para mí, por su amor incondicional.

A mi madre, porque sé que se sentirá orgullosa desde donde esté...

*Nunca es tarde para aprender.  
Nunca es tan tarde como para seguir luchando por realizar tus sueños...*  
NSS

# Agradecimientos

# Agradecimientos Académicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México. Porque pertenecer a la Máxima Casa de Estudios es un honor y un privilegio.

Al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (IFC, UNAM), mi segundo hogar.

Este proyecto se realizó en el laboratorio 306-Oriente del Instituto de Fisiología Celular, bajo la dirección del Dr. Antonio Peña Díaz a quien agradezco mucho por creer en mí, incentivar y apoyarme para terminar mis estudios de posgrado.

Agradezco a los miembros del comité tutor por las valiosas sugerencias y comentarios: Dr. Roberto Coria Ortega del IFC y Dr. Juan Pablo Pardo, Fac. de Medicina. En especial al Dr. Coria, quien fue de gran apoyo académico para la realización de este proyecto.

Mi agradecimiento a los miembros del jurado: Dra. Alicia González Manjarrez, Dr. César Cuevas Velázquez, Dr. José Francisco Torres Quiroz, Dra. Claudia Segal Kischinevzky y Dr. Javier Plasencia de la Parra por su amabilidad en revisar esta tesis y las sugerencias recibidas.

Agradezco por la asesoría técnica a la Dra. Martha Calahorra Fuertes, a la Dra. Laura Kawasaki Watanabe y al QFB Francisco Padilla Garfias del IFC, UNAM.

Al Dr. James González de la Facultad de Ciencias, UNAM, por su asesoría y participación en la realización del experimento de qPCR, clave en el entendimiento de mi proyecto.

Al Dr. Nicolas Papon y la Dra. Tatiana Defosse del *Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, Université d'Angers, Francia*, por la donación del plásmido pAYCU244 con el que fue posible cumplir con uno de los objetivos principales de este proyecto: la obtención de la mutante carente de *HOG1* en *Debaryomyces hansenii*.

A la Dra. Laura Ongay Larios, a la Biól. Guadalupe Códiz Huerta y a la M. en C. Minerva Mora Cabrera de la Unidad de Biología Molecular del IFC de la UNAM por la síntesis de desoxiligonucleótidos, secuenciación y préstamo de equipos.

A la Dra. Yazmín Ramiro, IFC, por su apoyo en la obtención de las imágenes en el microscopio de doble fotón.

Al personal de la Unidad de Cómputo del IFC, Ing. Juan Manuel Barbosa e Ing. Ivette Rosas Arciniega por su apoyo con los equipos de cómputo del laboratorio.

Al personal del taller del mantenimiento, Ing. Manuel Ortíz Benavides e Ing. Aurey Galván Lobato por siempre solucionarnos los problemas con las descomposturas en los equipos del laboratorio.

A las señoritas secretarias, Asistentes Ejecutivas del IFC, UNAM: Gabriela Valdés, Rocío Martínez Romualdo y Rosario Villaseñor por su apoyo siempre amable.

A las señoritas secretarias, Asistentes de Procesos del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM: Lety García y Adelina González; a Julio Ignacio Palacios Ordoñez, Asistente de procesos, del mismo Programa de Posgrado, a Sara Noguera Solano, Secretaria ejecutiva de la Coordinación de Enseñanza, IFC, UNAM por el apoyo recibido.

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y al Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM) por el apoyo económico para la asistencia y presentación de mi trabajo en el *32nd SMYTE (Small Meeting on Yeast Transport and Energetics)* en Montreal, Canadá en septiembre de 2014.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (PAPIIT, DGAPA, UNAM) por los donativos IN223399 e IN202103 al Dr. Antonio Peña.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el donativo CB-238497 al Dr. Antonio Peña.

## Agradecimientos personales

A mi querida amiga Martha Calahorra, por todos estos años de amistad y apoyo, ¡gracias! Te quiero mucho.

A Alice, muchas gracias por todo el apoyo y amistad; los atesoro en mi corazón.

A TODOS los alumnos que han pasado por el laboratorio, imposible nombrarlos a todos aquí, pero les dedico con mucho cariño esta Tesis ¡gracias por la huella que han dejado en mi vida!

A Arcadio, padre de mis hijos, quien en los últimos años me ha apoyado incondicionalmente para poder concluir mi Doctorado ¡muchas gracias!



## ÍNDICE

# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	2
RESUMEN .....	6
ABSTRACT .....	8
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
1.1 HALOFILIA Y HALOTOLERANCIA .....	10
1.2 LEVADURAS MARINAS.....	11
1.2.1 <i>La levadura Debaryomyces hansenii</i> .....	13
1.2.1.1 Generalidades.....	13
1.2.1.2 Homeostasis iónica en <i>D. hansenii</i> .....	15
1.3 ESTRÉS.....	18
1.3.1 <i>Respuestas al estrés: generalidades sobre la Respuesta General al Estrés, vía PKA y MAP</i> <i>cinzas 19</i>	
1.3.2 <i>Estrés osmótico</i> .....	24
1.3.2.1 Ósmosis, presión osmótica y osmolaridad .....	24
1.3.2.2 Estrés hiperosmótico.....	25
1.3.2.3 Activación de la vía HOG ( <i>High Osmolarity Glycerol response</i> ) .....	27
1.3.2.4 Biosíntesis y transporte de glicerol .....	34
1.3.2.5 Regulación de la homeostasis iónica en el estrés osmótico.....	38
1.3.3 <i>Estrés oxidante</i> .....	40
1.3.4 <i>Estrés de retículo endoplásmico</i> .....	43
1.3.5 <i>Adaptación al pH elevado</i> .....	44
<b>2 HIPÓTESIS .....</b>	<b>49</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>51</b>
<b>4 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>53</b>
4.1 CEPAS, PLÁSMIDOS Y MEDIOS DE CULTIVO .....	53
4.2 ENSAYOS DE CRECIMIENTO .....	53
4.3 CLONACIÓN, ELIMINACIÓN Y ETIQUETAMIENTO DE <i>DHHOG1</i> .....	54
4.4 TRANSFORMACIÓN DE LAS LEVADURAS .....	56
4.5 ENSAYOS DE FOSFORILACIÓN E INMUNODETECCIÓN.....	57
4.6 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA .....	57
4.7 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE GLICEROL.....	58
4.8 EXTRACCIÓN DE RNA.....	58
4.9 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	59
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
5.1 DETERMINACIÓN DE LA HALOTOLERANCIA DE <i>D. HANSENI</i> .....	61
5.2 CINÉTICA DE LA FOSFORILACIÓN DE <i>DHHOG1</i> COMO RESULTADO DE LA EXPOSICIÓN A NaCl .....	61
5.3 CONSTRUCCIÓN DE LA MUTANTE NULA <i>DHHOG1Δ</i> .....	64
5.4 <i>DHHOG1</i> SE REQUIERE PARA LA HALOTOLERANCIA EN <i>D. HANSENI</i> .....	68
5.5 <i>DHHOG1</i> SE TRANSLOCA PARCIALMENTE AL NÚCLEO DESPUÉS DE UN TRATAMIENTO HIPEROSMÓTICO. ....	69
5.6 <i>DHHOG1</i> REGULA LA TRANSCRIPCIÓN DE <i>DHGPD1</i> Y DE <i>DHSTL1</i> BAJO ESTRÉS HIPEROSMÓTICO .....	71

5.7	<i>DHOG1</i> CONTRIBUYE PARCIALMENTE A LA PRODUCCIÓN DE GLICEROL BAJO ESTRÉS HIPEROSMÓTICO.....	72
5.8	PARTICIPACIÓN DE <i>DHOG1</i> EN LA RESPUESTA A DIFERENTES FACTORES DE ESTRÉS .....	74
<b>6</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>88</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS METODOLÓGICOS .....</b>	<b>101</b>
9.1	ANEXO 1 .....	101
	EXTRACTOS PROTEICOS PARA WESTERN BLOT.....	101
9.2	ANEXO 2 .....	103
	ELECTROTRANSFERENCIA DEL GEL DE PROTEÍNA A MEMBRANA PARA WESTERN BLOT Y REVELADO.....	103
	REVELADO DE LA MEMBRANA DESPUÉS DE LA ELECTROTRANS-FERENCIA DEL GEL DE PROTEÍNAS.....	106
9.3	ANEXO 3 .....	109
	OBSERVACIÓN DE CÉLULAS ETIQUETADAS CON YEYFP EN CURVA DE TIEMPO CON SAL.....	109
9.4	ANEXO 4 .....	111
	EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE LEVADURA .....	111
<b>10</b>	<b>ARTÍCULO DE INVESTIGACION PUBLICADO.....</b>	<b>116</b>

## **ABREVIATURAS**

# ABREVIATURAS

AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
bp	<i>Base pairs</i> / pares de bases
CAT	Catalasa
cDNA	DNA complementario a una secuencia de RNA
clonNAT	Nourseotricina
DAPI	2-(4-amidinofenil)-1H -indol-6-carboxamida
DEPC	Dietilpirocarbonato
<i>Dh</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DNA	<i>Desoxiribonucleic acid</i> / Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GDH	Glutación reducido
GPX	Glutación peroxidasa
HEPES	Ácido 4-(2-Hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico, sal de sodio
HOG	<i>High Osmolarity Glycerol pathway</i> / Vía de alta osmolaridad del glicerol
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> / peroxidasa de rábano
LPS	Lipopolisacáridos
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i> / Proteína cinasa activada por mitógeno
MEK	MAP cinasas / ERK ( <i>Extracellular signal-regulated kinases</i> ) cinasas
MES	Ácido morfolinoetano sulfónico

Mg	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
MOPS	Ácido (3-[N-morfolino]propanosulfónico
mRNA	RNA mensajero
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining Repair system for DNA damage</i> / Vía no- homóloga de reparación de daño al DNA
NOX	Oxidasas de NADPH
ORF	<i>Open Reading Frame</i> / Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline solution</i> / Solución salina amortiguada con fosfatos
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> / Reacción en cadena de la polimerasa
PKA	Proteína cinasa A- dependiente de AMPc
PRX	Peroxiredoxina
RE	Retículo endoplásmico
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> / Ácido ribonucleico
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> / Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	<i>Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i> / Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, cuantitativa
SAT1	Gen de resistencia a nourseotricina (clonNAT)
Ser	Serina
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> / Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> / Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS
SOD	Superóxido dismutasa
TAPS	Ácido N-[Tris(hidroximetil)metil]-3-aminopropanosulfónico
TCA	Ácido tricloroacético
TEA	Trietanolamina
Thr	Treonina
TM	Transmembranal
Tyr	Tirosina
UDO <sub>600 nm</sub>	Unidades de densidad óptica a 600 nm
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i> / Respuesta a proteínas mal plegadas
3'UTR	<i>Untranslated Region in 3'</i> / región no traducida del gen en el extremo 3'
<i>yeYFP1</i>	<i>Codon optimized Yellow Fluorescent Protein</i> / Proteína amarilla fluorescente con uso de codones optimizado para levaduras del clado CTG
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i> / Medio de cultivo conteniendo extracto de levadura, peptona y dextrosa
WT	<i>Wild Type</i> / cepa tipo silvestre



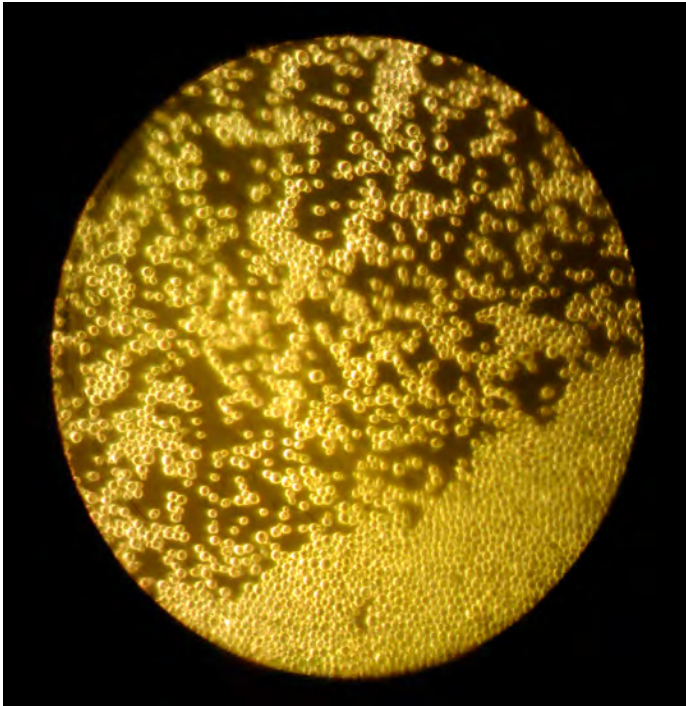
Caja de YPD con cultivo de *Debaryomyces hansenii*. Sí, así en uso...

**RESUMEN**



## RESUMEN

La halotolerancia se define como la capacidad de los organismos, tanto de vivir en ausencia de sal (NaCl), como también tolerar su presencia; en algunos casos a niveles elevados. Las especies halotolerantes están adaptadas para contender continuamente con ambientes hiperosmóticos, por haber desarrollado estrategias que son poco comunes en otros organismos. La vía de señalización de la MAP cinasa HOG1 (*High Osmolarity Glycerol response*) es el sistema maestro que regula la adaptación celular bajo estas condiciones; sin embargo, en *Debaryomyces hansenii*, una levadura halotolerante, su vía HOG ha sido pobremente estudiada, debido a la dificultad de aplicar en esta levadura la tecnología convencional de DNA recombinante. En este trabajo, describimos por primera vez la caracterización fenotípica de una mutante nula de *HOG1* en *D. hansenii*. Al contrario de lo ocurrido en *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura modelo, halosensible, en la que la mayor parte de las investigaciones se han hecho, la cepa *Dhhog1Δ* obtenida es moderadamente tolerante a NaCl 1 M y sensible a mayores concentraciones. Bajo un choque hiperosmótico, *DhHog1* controla completamente la sobreexpresión de *DhSTL1*, el simportador glicerol/H<sup>+</sup> de membrana plasmática y parcialmente la de *DhGPD1* que codifica para la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. Como resultado, el estrés hiperosmótico conduce a una acumulación interna de glicerol a largo plazo, pero solo parcialmente dependiente de *DhHog1*. Estas observaciones indican que la vía HOG es requerida para la supervivencia bajo alta osmolaridad externa pero prescindible bajo condiciones de baja y mediana osmolaridad. También se descubrió que *DhHog1* puede regular la respuesta a estrés alcalino (pH= 8.0) durante condiciones hiperosmóticas y que desempeña un papel en el estrés oxidante y en el estrés del retículo endoplásmico. Tomados en conjunto, estos resultados proporcionan una nueva visión de la contribución de esta MAP cinasa en la halotolerancia de esta levadura.

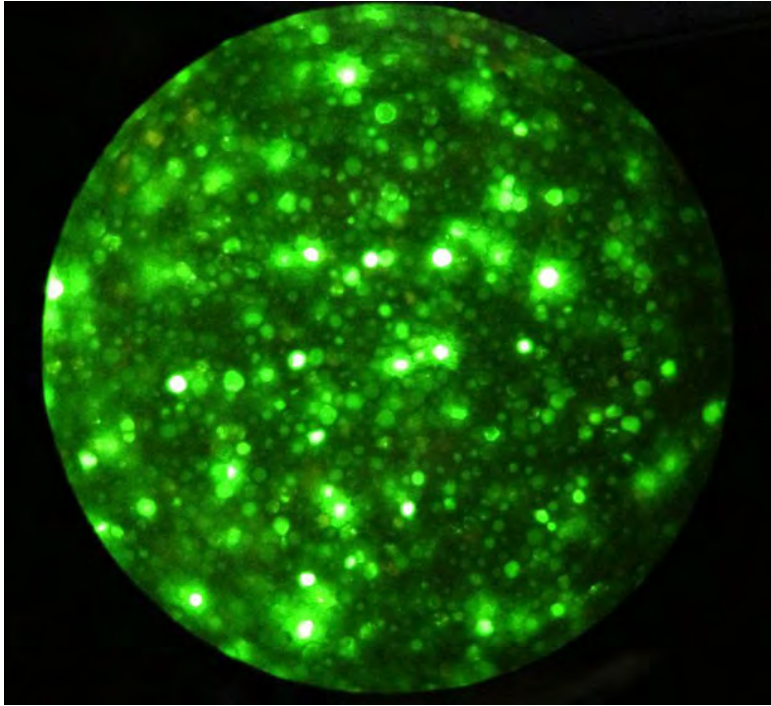


*D. hansenii*, microscopio óptico en campo oscuro, 60X.

**ABSTRACT**

## ABSTRACT

Halotolerance is defined as the ability of organisms to live in the absence of salt (NaCl) and to tolerate its presence, in some cases at high levels. Halotolerant species are adapted to continually contend with hyperosmotic environments, having developed strategies that are rare in other organisms. The HOG1 MAP kinase signaling pathway is the master system that regulates cellular adaptation under these conditions; however, in *Debaryomyces hansenii*, a halotolerant yeast, its HOG (*High Osmolarity Glycerol response*) pathway has been poorly studied, due to the difficulty of applying conventional recombinant DNA technology in this yeast. In this work, we describe for the first time the phenotypic characterization of a *HOG1* null mutant in *D. hansenii*. Contrary to what is known in *Saccharomyces cerevisiae*, a halo-sensitive model yeast, in which most of the investigations have been done, the *Dhhog1* $\Delta$  strain obtained is moderately tolerant to 1 M NaCl and sensitive to higher concentrations. Under hyperosmotic shock, *DhHog1* completely controls the overexpression of *DhSTL1*, the plasma membrane glycerol / H<sup>+</sup> symporter, and partially that of *DhGPD1* encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase. As a result, osmotic stress led to long-term internal glycerol accumulation that was partially dependent on *DhHog1*. These observations indicate that the HOG pathway is required for survival under high external osmolarity but dispensable under conditions of low and medium osmolarity. It was also found that *DhHog1* can regulate the alkaline stress response (pH = 8.0) during hyperosmotic conditions and that it plays a role in oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. Taken together, these results provide a new insight into the contribution of this MAP kinase in the halotolerance of this yeast.



“La Luna Verde” *D. hansenii* electroporada con piranina para medir pH interno y observada en el microscopio de epifluorescencia, 60X.

## 1 INTRODUCCIÓN

# 1 INTRODUCCIÓN

El nicho ecológico de una especie se define por sus requerimientos y por su papel o función en el ambiente. El concepto de nicho ecológico fue introducido por Grinnell en 1917 y se enfocaba solamente en el requerimiento de un hábitat para que cierta especie sobreviviera y se reprodujera. En 1959, Hutchinson expandió esta definición de nicho, al tomar en cuenta los múltiples recursos que contiene: el espacio físico que ocupa, la temperatura y las condiciones de humedad y la estacionalidad en condiciones bióticas y abióticas que la zona experimenta, junto con los requerimientos de alimentación o las interacciones que una especie lleva a cabo en conjunto con otras especies (Moore, 2013).

Una población, comunidad o ecosistema, será estable si puede persistir a través del tiempo y se puede recuperar de disturbios menores. Un disturbio es cualquier perturbación al sistema que ocasiona que cualquiera de las especies o grupos funcionales se desvíen de su estado de equilibrio. Las especies evolucionan y las comunidades y los ecosistemas cambian. Y aquí actúa la selección natural. La selección natural es la perpetuación de genes en generaciones sucesivas causadas por diferentes grados de adaptabilidad al ambiente y además, en la adaptabilidad de una especie se incluye el grado en que ésta es compatible con la estabilidad del ecosistema como un todo (Moore, 2013).

## 1.1 Halofilia y halotolerancia

La vida microbiana se encuentra presente en ambientes con diferentes márgenes de concentración de sal, desde el agua dulce y marina hasta ambientes hipersalinos con concentraciones de NaCl cercanas a la saturación. Hay microorganismos halófilos y halotolerantes pertenecientes a los tres dominios de la vida: *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya* que pueden colonizar exitosamente todo tipo de ambientes tales como lagos salados o comida salada y pueden alcanzar densidades poblacionales muy altas. Los *halófilos* se caracterizan por necesitar condiciones salinas para su crecimiento, mientras que los *halotolerantes* pueden crecer tanto en medios con salinidad elevada como en ausencia de sal (DasSarma & DasSarma, 2012). Aquéllos halotolerantes capaces de crecer arriba de 15% de NaCl (2.5 M) se consideran halotolerantes extremos. Entre los halófilos, sin embargo, se pueden distinguir los halófilos ligeros, como muchos organismos marinos, ya que el agua de mar contiene aproximadamente 3% de NaCl; los halófilos moderados, con crecimiento óptimo de 3 a 15% de NaCl; los halófilos

extremos, con crecimiento óptimo a 25% de NaCl, como algunas halobacterias y los halófilos extremos al límite o *borderline*, que requieren forzosamente de al menos 12% de NaCl para crecer (Margesin & Schinner, 2001).

Dado que las membranas biológicas son permeables al agua, las células no pueden mantener la actividad de ésta en su citoplasma más alta de lo que está en el ambiente salado externo, porque ello ocasionaría una pérdida considerable de agua hacia el exterior. Por ello, cualquier microorganismo que vive en concentraciones elevadas de sal debe mantener su citoplasma al menos isotónico con respecto al ambiente extracelular.

Existen dos estrategias fundamentales en el ambiente microbiano que permiten a los microorganismos contender con el estrés osmótico inherente a la presencia de una concentración elevada de sal: (i) las células mantienen una concentración intracelular alta de sal, al menos osmóticamente equivalente a la concentración externa (la estrategia “salt-in”) y por lo tanto, todos los sistemas intracelulares deben estar adaptados a dicha estrategia; por ejemplo, enzimas tolerantes a la sal con características especiales, como un alto porcentaje de aminoácidos ácidos y pocos aminoácidos hidrofóbicos. (ii) Las células mantienen una baja concentración de sales (la estrategia “salt-out”); la presión osmótica del medio es entonces balanceada con solutos compatibles orgánicos (Oren, 1999). Los solutos compatibles pueden ser sintetizados por el propio microorganismo o pueden ser internalizados del exterior cuando están disponibles. Esta estrategia no requiere de proteínas especialmente adaptadas. Los solutos compatibles se definen como aquellos que a altas concentraciones (en el orden de molar), permiten el funcionamiento adecuado de las enzimas. La naturaleza química de estos es variada, desde polioles como el glicerol y arabitol, azúcares como la trehalosa y sacarosa, aminoácidos y aminos cuaternarios como la glicina betaína. La característica común es que son de bajo peso molecular, solubles en agua con o sin carga o zwitteriónicos a pH fisiológico (Oren, 1999).

Cualquiera que sea la estrategia utilizada para contender con el estrés hiperosmótico, es obvio que la vida en altas concentraciones de sal es muy costosa desde el punto de vista energético. Ya se trate de establecer y mantener un gradiente importante de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de la membrana celular o de la biosíntesis de grandes cantidades de compuestos orgánicos compatibles, ambos son mecanismos que implican un gasto de energía para la célula.

## 1.2 Levaduras marinas

Las levaduras en ambientes marinos pueden provenir de la erosión o acarreo producidos por las corrientes de agua superficiales o también encontrarse asociadas a la fauna y flora acuática de los océanos. En los últimos 40 años, se

han reunido suficientes evidencias para establecer que las levaduras que han sido aisladas del medio ambiente marino son parte constitutiva de la población microbiana marina, por lo que se les puede considerar como “levaduras marinas”. En ellas se incluye a todas aquellas capaces de constituir y perpetuar poblaciones en el medio marino, o aquellas cuya reproducción y crecimiento ocurren preferentemente en el mar, o cuyas condiciones óptimas son las concentraciones normales de sales en el mar, entre 2.4 - 4 % de cloruro de sodio (0.41 M a 0.68 M de NaCl) (Ochoa & Vázquez-Juárez, 2004).

Los estudios pioneros sobre levaduras marinas, fueron realizados en Suecia por el grupo de Norkrans, quienes investigaron si levaduras del género *Debaryomyces*, *Pichia* y *Candida* eran capaces de reproducirse en medios alcalinos, con alta concentración de NaCl y baja temperatura (Norkrans, 1966). Las especies de levaduras marinas se encuentran asociadas a ambientes ricos en materia orgánica, de donde se han aislado desde la superficie del mar hasta profundidades de 4000 m. Pueden asimismo soportar las tres características principales del agua de mar: la salinidad, alrededor de 0.6 M de NaCl; el pH, cercano a 8.0 y la temperatura, que depende de la profundidad y la ubicación geográfica (Kandasamy, Alikunhi, & Subramanian, 2012).

La salinidad del agua de mar promedio tiene una composición definida donde abundan seis iones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ ); sin embargo, puede haber hábitats donde predomina algún ión, como ocurre en los estuarios, las lagunas salobres, donde el sodio es uno de los principales; en esos hábitats están presentes microorganismos halófilos y halotolerantes. Son varios los géneros de levaduras encontrados en el agua de mar, entre los que se pueden mencionar a *Aspergillus*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Exophiala*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* y *Yarrowia*; su importancia ecológica radica, al menos en parte, en que participan en el reciclaje de la materia orgánica en el océano. Además, son útiles como fuentes de reactivos biológicos, proteína unicelular, vitaminas, pigmentos y probióticos y algunas de ellas pueden ser patógenas (Ochoa & Vázquez-Juárez, 2004).

Los hongos halófilos según Gunde-Cimerman y colaboradores, se pueden definir como aquellos que se se pueden aislar en medios salinos selectivos a partir de ambientes con una salinidad de más del 10% y que se pueden cultivar *in vitro* en medios con un mínimo de 17% de NaCl (2.9 M) (Gunde-Cimerman, Ramos, & Plemenitaš, 2009). Por otro lado, si son aislados de un medio con menor salinidad, pero son capaces de sobrevivir *in vitro* a una concentración de 17% de NaCl, son definidos como halotolerantes (Musa, Kasim, Nagoor Gunny, & Gopinath, 2018), donde *Debaryomyces hansenii* podría clasificarse sin duda alguna.

## 1.2.1 La levadura *Debaryomyces hansenii*

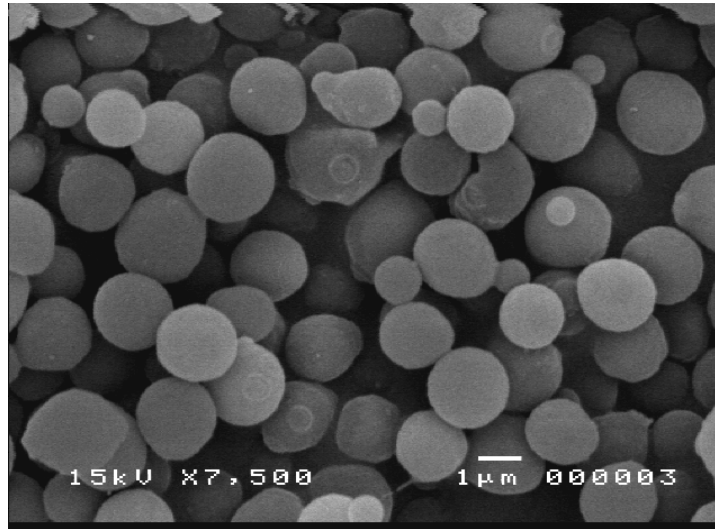
### 1.2.1.1 Generalidades

*Debaryomyces hansenii* (Fig. 1.1) se considera una levadura no convencional, es decir, que no es ni *Saccharomyces cerevisiae* ni *Schizosaccharomyces pombe* y pertenece a los ascomicetos. Es una levadura que originalmente fue aislada del agua de mar en Suecia (Norkrans, 1966), por ello, es un modelo de organismo eucarionte muy utilizado para investigaciones sobre estrés salino. *D. hansenii* puede soportar concentraciones de sal de hasta 4 M, pero dado que es capaz de vivir en ambientes marinos, también resiste valores de pH elevados. El agua de mar tiene un pH aproximado de 8 y como se mencionó anteriormente, tiene además una concentración de NaCl que va de 0.41 a 0.68 M.

La capacidad de *D. hansenii* de contender con tan alta concentración de sal es el resultado de varias propiedades que funcionan concertadamente. Éstas incluyen una homeostasis particular del sodio y el potasio (Norkrans, 1966, 1968), la composición de su membrana citoplasmática (Turk, Montiel, Žigon, Plemenitaš, & Ramos, 2007), la presencia de transportadores de cationes y de glicerol (Lages, Silva-Graça, & Lucas, 1999; Martínez, Sychrova, & Ramos, 2011; Michán et al., 2013; Prista, Almagro, Loureiro-Dias, & Ramos, 1997; Prista, Michán, Miranda, & Ramos, 2016; Ramos, Ariño, & Sychrová, 2011), la resistencia de algunas de sus enzimas al estrés salino o la inducción de su expresión por altas concentraciones de sal (Alba-Lois et al., 2004; Chawla, Kundu, Randhawa, & Mondal, 2017; Guerrero et al., 2005; Minhas et al., 2012; Sharma, Meena, Aggarwal, & Mondal, 2005) y la optimización de las vías de obtención de energía por la presencia de sal (Cabrera-Orefice, Chiquete-Félix, et al., 2014; Cabrera-Orefice, Guerrero-Castillo, Díaz-Ruíz, & Uribe-Carvajal, 2014; Calahorra, Sánchez, & Peña, 2009; Sánchez, Calahorra, González-Hernández, & Peña, 2006; Sánchez, Arreguín, Calahorra, & Peña, 2008), entre otras características.

En cuanto al efecto de los cationes monovalentes en *D. hansenii*, el grupo de Lucas estudió el efecto del Na<sup>+</sup> o el K<sup>+</sup> sobre algunos parámetros de crecimiento y la respiración y fermentación, sin encontrar diferencias significativas con ambos iones (M. L. Neves, Oliveira, & Lucas, 1997). En el mismo año, se reportó que mientras *S. cerevisiae* es inhibida por Na<sup>+</sup> y por Li<sup>+</sup>, *D. hansenii* sólo es afectada por Li<sup>+</sup>; además que concentraciones relativamente altas de NaCl (0.5 M) mejoraron el crecimiento de *D. hansenii* (Prista et al., 1997). Concentraciones más altas de NaCl o KCl (1.5- 2.0 M) disminuyen el crecimiento, pero este efecto parece ser más bien debido a un efecto osmótico no específico.





**Figura 1.1** Microfotografía electrónica de barrido de células de *Debaryomyces hansenii*. Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. La barra indica la escala de 1  $\mu\text{m}$ .

Los niveles de ATP son más altos en células cultivadas en NaCl 1 M que en KCl 1 M (Thomé-Ortiz, Peña, & Ramírez, 1998), lo que habla de la preferencia por la sal de sodio de esta levadura. Se ha visto que el  $\text{Na}^+$  protege de factores de estrés adicionales; mientras que *S. cerevisiae* se adapta mejor a pH ácido o a alta temperatura, *D. hansenii* muestra un mejor comportamiento a pH elevado o temperaturas elevadas en presencia de sal (Almagro et al., 2000).

*D. hansenii* es además criotolerante (resistente a temperaturas bajas) que junto con su capacidad para soportar altas concentraciones de sal, son características de importancia para su papel en algunos procesos agro-alimenticios; se utiliza en la fabricación y maduración de embutidos y quesos a los que confiere sabor y aroma característicos. Es la especie más común en todos los tipos de quesos, en productos lácteos y en salmueras; es capaz de metabolizar ácidos láctico y cítrico (Seiler & Busse, 1990). *D. hansenii* además provee de la actividad proteolítica y lipolítica que se requiere para la maduración de algunos quesos y embutidos.

*D. hansenii* es normalmente considerada como no patógena; sin embargo, se ha reportado al menos un caso de infección en huesos asociada con esta levadura (Wong et al., 1982), se ha identificado en muestras clínicas de infecciones superficiales, junto con su anamorfo, *Candida famata* (Nishikawa, Tomomatsu, Sugita, Ikeda, & Shinoda, 1996) y se ha registrado como presente en el 0.2- 2.0%

de casos de candidiasis invasivas en sangre sobre todo en pacientes inmunocomprometidos (Beyda et al., 2013).

La mayoría de las especies de *D. hansenii* son haploides, se aparean muy raramente y diploidizan transitoriamente por autogamia para formar un asca que suele contener una espora única (Kreger van Rij & Veenhuis, 1975; Van der Walt, Taylor, & Liebenberg, 1977). Tiene dos plásmidos lineales de DNA cuya estabilidad depende de la alta presión osmótica (Cong, Yarrow, Li, & Fukuhara, 1994). *D. hansenii* pertenece al gran clado de especies de levaduras que comprenden la mayoría de las especies de *Candida* y *Pichia*; por lo tanto, desde el punto de vista filogenético, está muy relacionada con la patogénica *Candida albicans*, con la que comparte ciertas características.

La secuencia del genoma de la cepa tipo de *D. hansenii* CBS76, revela que tiene 7 cromosomas de entre 1.25 Mb y 2.33 Mb con un tamaño total de 12.2 Mb. Tiene la más alta capacidad codificante entre las levaduras, con un total del 79.2 % del genoma con 6906 secuencias que suponen ser genes. Además es la levadura con el genoma más redundante, con un aproximado del 49.2% de secuencias repetidas al menos una vez.

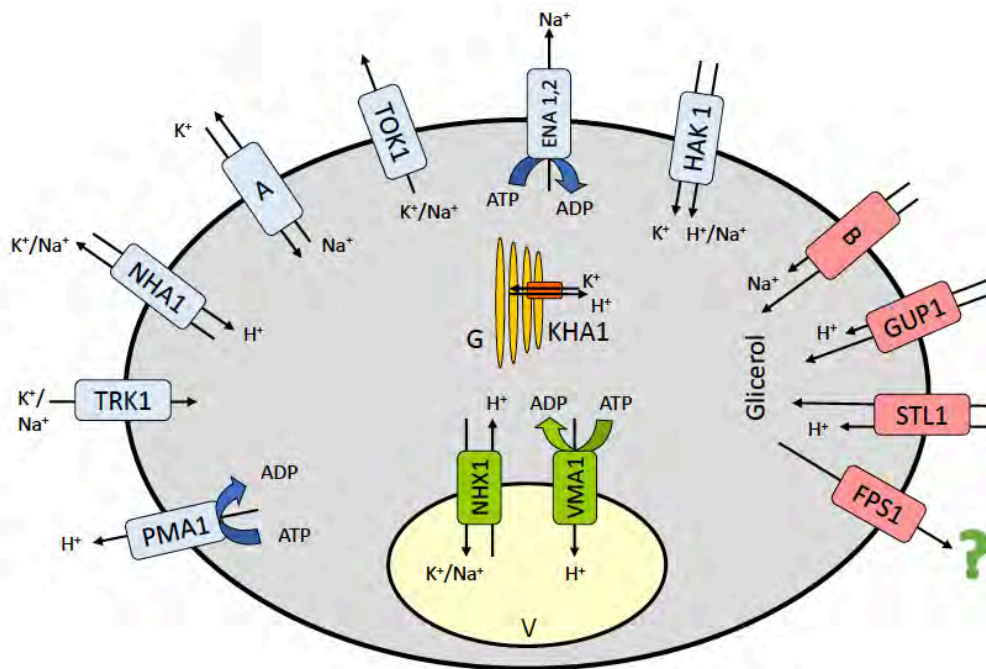
### 1.2.1.2 Homeostasis iónica en *D. hansenii*

Para mantener las concentraciones óptimas de cationes metálicos alcalinos, las células de levadura utilizan una serie de sistemas de entrada y extrusión. Las especies de levaduras no convencionales tienen al menos 3 diferentes tipos de transportadores muy eficientes que aseguran la entrada y acumulación del potasio en las células (el principal catión intracelular de las levaduras). La mayoría de ellas tienen uniportadores Trk y simportadores Hak ( $K^+H^+$ ) y algunas especies de levaduras tienen también a la poco común ATPasa de entrada de  $K^+Na^+$ , Acu. Para eliminar el exceso de los cationes  $K^+$  o de  $Na^+$ , que es tóxico, varias especies de levadura utilizan a los altamente conservados antiportadores Nha ( $Na^+K^+/H^+$ ) y a las ATPasas de extrusión Ena ( $Na^+K^+$ ). El canal específico para potasio Tok1 en levaduras, también está altamente conservado en varias especies y su actividad es muy importante para la regulación del potencial eléctrico de la membrana plasmática (Ramos et al., 2011).

Varios grupos han demostrado que el sodio no es tóxico para *D. hansenii*; al cultivarla en altas concentraciones de NaCl ó KCl es capaz de acumular y resistir altas concentraciones de  $Na^+$  (sodio incluyente) ó  $K^+$ , a diferencia de *S. cerevisiae* (sodio excluyente) (Norkrans & Kylin, 1969; Prista et al., 1997; Thomé-Ortiz et al., 1998) y además puede hacer intercambios rápidos de  $Na^+$  por  $K^+$ .

*D. hansenii* tiene sistemas de transporte e intercambio de iones particulares y muy eficientes: a) una ATPasa funcional que contribuye al bombeo de protones (PMA1 en Fig. 1.2), que genera una diferencia en el potencial de membrana y es aprovechado para transportar  $K^+$  (o  $Na^+$ ) a través de un uniportador (TRK1 en Fig. 1.2), que sería el equivalente a Trk1p de *S. cerevisiae*; b) un sistema intercambiador de  $Na^+K^+/H^+$  (NHA1 en Fig. 1.2) además de, c) un posible intercambiador catión/catión (A en Fig. 1.2) (Thomé-Ortiz et al., 1998).

En cultivos con altas concentraciones de cationes monovalentes, se acumulan sales que pueden ser expulsadas al exterior en medios con bajo contenido de sal por la presencia de un canal iónico (TOK1 en Fig. 1.2). Un intercambiador  $K^+/Na^+$  no parece ser el mecanismo principal de salida, ya que se observa la extrusión de cationes aún en ausencia del catión opuesto. Además, este canal de cationes propuesto parece no ser específico, ya que promueve la salida de ambos cationes. Aunque no puede eliminarse la existencia de un intercambiador  $H^+/catión$ , la magnitud de los cambios parece favorecer la existencia de un canal iónico (J. C. González-Hernández, Cárdenas-Monroy, & Peña, 2004).



**Figura 1.2** Transportadores encargados de la homeostasis iónica y osmótica en *D. hansenii*. G: Golgi; V: Vacuola. El signo de interrogación para FPS1 indica que no se ha encontrado un ortólogo para este gen correspondiente al canal de glicerol de *S. cerevisiae* en el genoma de *D. hansenii*. La figura se realizó con el contenido de la bibliografía referida en el texto.

Almagro y colaboradores, clonaron y secuenciaron los genes *ENA1* y *ENA2*, que codifican para Na<sup>+</sup>-ATPasas tipo P en *D. hansenii*, que expulsan al Na<sup>+</sup> (ENA 1, 2 en Fig. 1.2) (Almagro et al., 2000); su expresión aumenta en concentraciones elevadas de Na<sup>+</sup> y alto pH. En *S. cerevisiae* la compartimentalización interna prevacuolar del Na<sup>+</sup> está mediada por un antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, codificado por el gen *NHX1*, el cual está energizado por el gradiente de pH generado por una H<sup>+</sup>-ATPasa vacuolar de tipo V (VMA1 en la Fig. 1.2) (Ramón Serrano & Rodríguez-Navarro, 2001); se ha propuesto que en *D. hansenii* ocurre el mismo fenómeno de acumulación por un sistema similar al descrito en *S. cerevisiae*, secuestrando el exceso de Na<sup>+</sup> en la vacuola y/o compartimientos prevacuolares, manteniendo una concentración citosólica de Na<sup>+</sup> no tan elevada (Herrera, Salazar, Ramos-Moreno, Ruiz-Roldan, & Ramos, 2017).

Lucas y colaboradores reportaron que la presencia de sal estimula la acumulación de glicerol a través de un posible simportador Na<sup>+</sup>-glicerol que también puede utilizar K<sup>+</sup> (B en Fig. 1.2) (Lucas, Da Costa, & Van Uden, 1990). En *S. cerevisiae* *GUP1* es un transportador activo de glicerol cuando éste es la única fuente de carbono (Holst et al., 2000). Un simportador de glicerol-H<sup>+</sup> (*STL1* en Fig. 1.2) se expresa cuando las células se someten a un choque osmótico. Luyten y colaboradores sugirieron que el gen *FPS1* en *S. cerevisiae* codifica para un canal que participa en el transporte del glicerol hacia el espacio extracelular, el cual puede controlar su producción y concentración interna (Luyten et al., 1994), sin embargo, la búsqueda en el genoma de *D. hansenii* del ortólogo de *STL1*, no arroja información como se expone en la discusión de este trabajo.

En 2007, el grupo de Ramos clonó y expresó heterológicamente el gen *DhKHA1* en *S. cerevisiae*, reportando que tiene una función diferente a su ortólogo *ScKHA1* (descrito como un antiportador intracelular K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>), ya que su sobreexpresión en *S. cerevisiae* promueve la tolerancia a Na<sup>+</sup>, pero no afecta el crecimiento a alto pH o en presencia de higromicina B (Carcía-Salcedo, Montiel, Calero, & Ramos, 2007). Lo clasificaron como un transportador intracelular Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>.

Por otro lado, (Martínez et al., 2011) describieron que en bajas concentraciones de K<sup>+</sup>, el transportador preferentemente utilizado por *D. hansenii* es *HAK1* (*High Affinity for K<sup>+</sup>*) y que trabaja como un simportador con H<sup>+</sup>, mientras que en presencia de concentraciones milimolares de Na<sup>+</sup>, puede utilizar a este catión en el cotransporte; pero que en altas concentraciones de K<sup>+</sup>, es *TRK1* el que se expresa, funcionando como uniportador.

La exposición de las levaduras a estrés salino implica tanto la exposición a la toxicidad específica de cationes como al estrés osmótico. Ciertos iones, como el Na<sup>+</sup> o el Li<sup>+</sup> son tóxicos para las células, debido a su capacidad de inhibir vías

metabólicas específicas, probablemente a través de blancos específicos. Esto se ha demostrado en el caso de la proteína Hal2 y ciertas enzimas de procesamiento de RNA (Posas et al., 2000). Por ello, la regulación del contenido iónico intracelular representa una respuesta muy importante al estrés iónico. De hecho, la exposición al sodio incrementa la expresión del gen *ENA1/PMR2A*.

En *S. cerevisiae* la delección de *SchAL2* no afecta su capacidad para crecer en sal, pero su sobreexpresión incrementa significativamente su tolerancia a la sal. Hal2p es una nucleotidasa que hidroliza 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato (PAP) a AMP para reciclar a la adenosina y también está involucrada en la biosíntesis de metionina. En *S. cerevisiae* esta proteína es muy sensible a Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup>, por lo que se considera la enzima blanco de la toxicidad de estos cationes. Se ha identificado y caracterizado en *D. hansenii* y su expresión en *S. cerevisiae* le confiere una halotolerancia aumentada tanto a Na<sup>+</sup> como a Li<sup>+</sup> (Aggarwal, Bansal, & Mondal, 2005).

## 1.3 Estrés

La exposición de las células a condiciones adversas de crecimiento o a cualquier ambiente que reduzca la viabilidad o las aptitudes celulares se considera como una forma de estrés. Los diferentes tipos de estrés se pueden agrupar en: leve, crónico y agudo el cual representa un cambio dramático en las condiciones ambientales.

En respuesta a estos cambios, se requieren respuestas celulares inmediatas y específicas para una adaptación adecuada y con ello, maximizar la supervivencia celular.

Aunque en distinta medida, los organismos unicelulares y las células de organismos multicelulares están expuestos a constantes cambios en el entorno que los ponen en riesgo. Por lo tanto, el aumento en el estrés oxidante, los cambios en el pH externo, suministro de nutrientes, los cambios de temperatura o los desequilibrios en la osmolaridad requieren respuestas adaptativas para la supervivencia celular máxima. Las respuestas de adaptación dependen del organismo, el medio ambiente natural en el que se ha seleccionado evolutivamente y su estado físico actual.

Las células eucarióticas han desarrollado mecanismos de detección sofisticados y sistemas de transducción de señales que pueden producir resultados precisos en respuesta al estrés; la activación de las vías de

señalización intracelular controla casi todos los aspectos de la fisiología general de la célula (de Nadal, Ammerer, & Posas, 2011).

Los cambios de expresión de genes y los cambios subsecuentes de la fisiología celular son componentes importantes de las respuestas de estrés, e incluyen alteraciones en el metabolismo, la progresión del ciclo celular y la modificación de las actividades enzimáticas.

Las respuestas al estrés son particularmente importantes en el ambiente ampliamente variable de los microorganismos, donde las condiciones de temperatura, osmolaridad o disponibilidad de nutrientes están lejos de ser constantes. Estas respuestas se componen de respuestas genéricas, compartidas por muchos tipos de estrés y las respuestas de adaptación específicas. Tanto las genéricas como las respuestas específicas tienen desde efectos post-traduccionales, que proporcionan respuestas inmediatas, hasta la regulación de la expresión génica, que será esencial para la adaptación más lenta, a largo plazo y las fases de recuperación.

### 1.3.1 Respuestas al estrés: generalidades sobre la Respuesta General al Estrés, vía PKA y MAP cinasas

En las levaduras se ha observado que cuando se induce la tolerancia a cierto tipo de estrés, se puede al mismo tiempo inducir tolerancia a otros tipos de estrés, aún cuando estos últimos sean letales. Este fenómeno ocurre aun en ausencia de una inducción previa. Así, por ejemplo, cuando un cultivo de levaduras se somete a un tratamiento moderado de calor (37°C por media hora), estas células son capaces de resistir un choque de peróxido de hidrógeno que de otro modo sería letal. A este fenómeno se le ha denominado “protección cruzada”, y ha dado lugar a la idea de que la levadura posee mecanismos comunes o generales de respuesta al estrés (Folch-Mallol, Garay-Arroyo, Lledías, & Covarrubias Robles, 2004).

Los factores de transcripción Msn2/Msn4 son los intermediarios para la **respuesta general a estrés**. Bajo condiciones normales (sin estrés), estos factores están localizados en el citoplasma, pero bajo condiciones de exposición al estrés, rápidamente se translocan al núcleo donde se unen a los elementos de control STRE (por sus siglas en inglés: *Stress Responsive Element*), con la secuencia consenso GAAAA, en los promotores de un gran número de genes de respuesta a estrés (Rep, Krantz, Thevelein, & Hohmann, 2000). Esto resulta en un cambio drástico, temporal en el perfil transcripcional de las células de levadura. Un

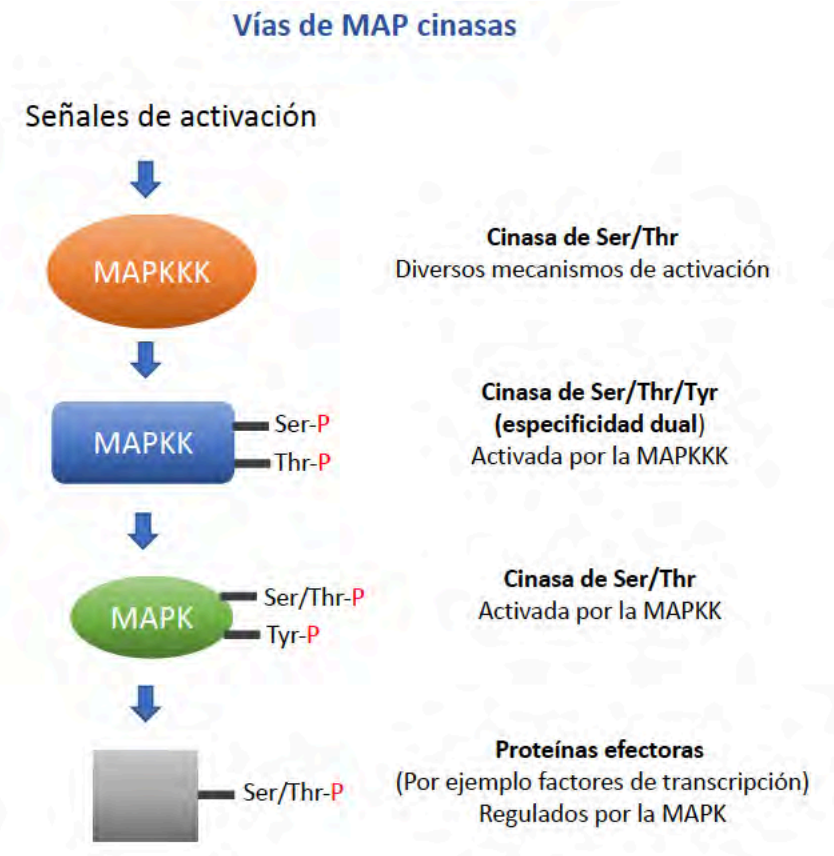
ejemplo clásico es el gen de la catalasa T citosólica *CTT1*, la cual se induce por múltiples condiciones de estrés (osmótico, oxidante, térmico); estudios en el promotor de este gen llevaron a la identificación de la secuencia consenso antes mencionada, y después se identificó también en promotores de múltiples genes de respuesta a estrés. La localización celular de Msn2/4 es regulada por la actividad de la proteína cinasa A (PKA) dependiente de AMPc: bajo condiciones de alta actividad de PKA, los factores permanecen en el citoplasma, mientras que en condiciones de baja actividad de PKA, se mantienen preferentemente en el núcleo. Por lo que uno de los controles importantes de la respuesta general al estrés implica el nivel de AMPc.

**La vía de la PKA** es importante en la percepción nutricional del medio y la respuesta al estrés. El AMPc es sintetizado por la adenilato ciclasa a partir de ATP y las células con una actividad disminuida de adenilato ciclasa se dividen lentamente y presentan alta tolerancia al estrés por calor (Folch-Mallol et al., 2004). Esta vía se activa al añadir glucosa a células que provienen de medios de cultivo con fuentes de carbono no fermentables como etanol o acetato o que están en fase estacionaria o diáuxica. Cuando se añade glucosa, se estimula el incremento en los niveles de AMPc y esto a su vez activa a la PKA. Algunas situaciones de estrés disminuyen la actividad de la vía, y ello estimula la expresión de genes de respuesta a estrés. Todavía se conoce poco acerca de los blancos fosforilables por la PKA, entre los cuales se encuentra la 6-fosfofructo-2-cinasa, que regula positivamente a la glucólisis sintetizando fructosa 2,6-bisfosfato, regulador de la enzima clave 6-fosfofructo-1-cinasa. La PKA también fosforila en este sentido, a la piruvato cinasa, también una enzima clave de la regulación glucolítica (Folch-Mallol et al., 2004).

**Las proteínas cinasas MAPK** (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) son una familia de proteínas señalizadoras altamente conservadas en eucariontes que transducen señales intracelulares llevando a cabo la respuesta y la adaptación como resultado de uno o más agentes estresantes. Las MAP cinasas transmiten, amplifican e integran la señal tras su activación, para desencadenar una respuesta fisiológica adecuada a través de la expresión génica. Las vías MAPK regulan diversos procesos, desde la proliferación y la diferenciación celular hasta la apoptosis y están presentes desde levaduras hasta humanos. Se activan por una gran variedad de estímulos y fosforilan numerosas proteínas entre las que se encuentran factores de transcripción, proteínas de citoesqueleto, cinasas y otras enzimas e influyen de manera importante en la expresión génica, metabolismo, división celular, morfología y supervivencia de la célula (Qi, 2005).

Cada vía de MAPK está compuesta de una cascada de 3 cinasas que comprenden: una MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK, MAP3K, MEKK o MKKK),

una MAP cinasa cinasa (MAPKK, MAP2K, MEK o MKK) y la MAPK. Las MAPKs se activan por doble fosforilación en residuos conservados de treonina y tirosina en el asa de activación (denominado sitio TXY) y fosforilan blancos en residuos de serina y treonina con un motivo consenso PXT/SP (la X depende de la MAPK que se trate). La especificidad de la vía es regulada a diferentes niveles, incluyendo interacciones cinasa-cinasa y cinasa-sustrato, colocación de cinasas por medio de proteínas de andamiaje e inhibición por las propias MAPKs (Fig. 1.3).

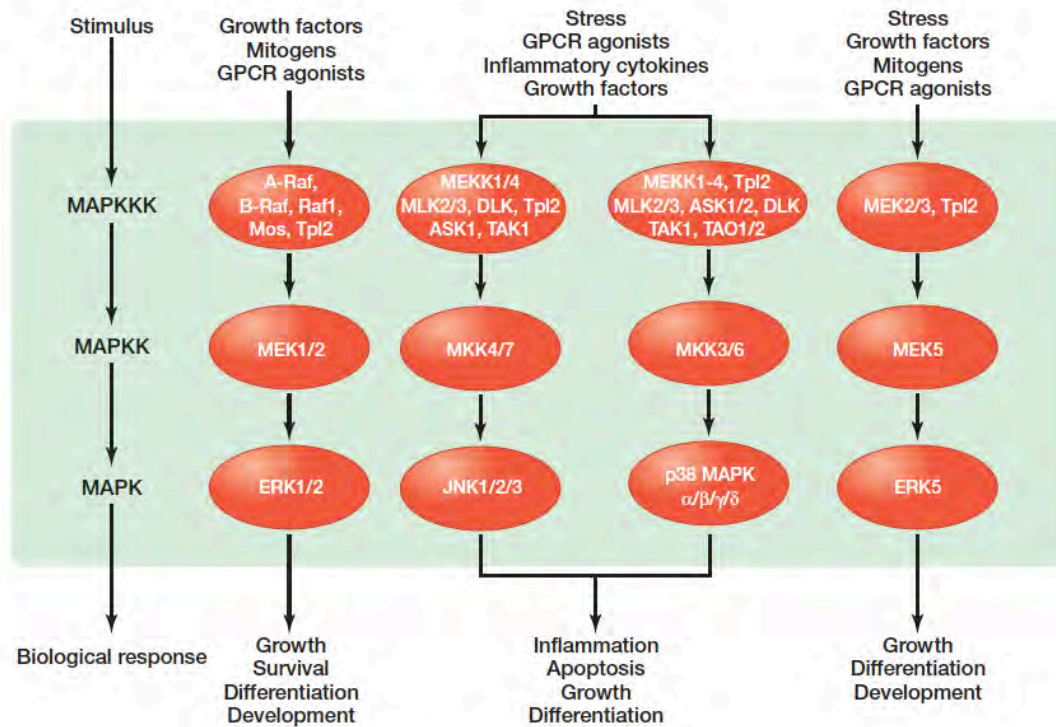


**Figura 1.3** Diagrama esquemático de una vía de MAPcinasas. El módulo central de una vía de MAP cinasas está compuesto de tres cinasas que se activan secuencialmente por fosforilación. Ser, serina; Thr, treonina; Tyr, tirosina; P, fosforilación.

En mamíferos, las MAP cinasas se pueden agrupar en 3 familias principales: las ERKs (*extracellular-signal-regulated kinases* o cinasas reguladas por señales extracelulares), JNKs (*Jun amino-terminal kinases* o cinasas Jun N-terminal) y las p38/SAPKs (*stress-activated protein kinases* o cinasas activadas por estrés). Las cinasas de la familia ERK (1/2) responden a factores de crecimiento y mitógenos para inducir crecimiento celular y diferenciación. Los miembros de la familia JNK (1/2/3) son activados por estrés ambiental (radiación ionizante, calor, estrés oxidante y daño al DNA) así como por citocinas inflamatorias y factores de crecimiento; tienen un papel muy importante en la apoptosis, inflamación,



producción de citocinas y el metabolismo. Los miembros de la familia p38 poseen un motivo TGY en el segmento de activación e incluyen a p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ . Son fuertemente activados por estrés ambiental y citocinas inflamatorias. La activación de p38 contribuye a la respuesta inflamatoria, apoptosis, diferenciación celular y regulación del ciclo celular (Fig. 1.4) (Morrison, 2012).

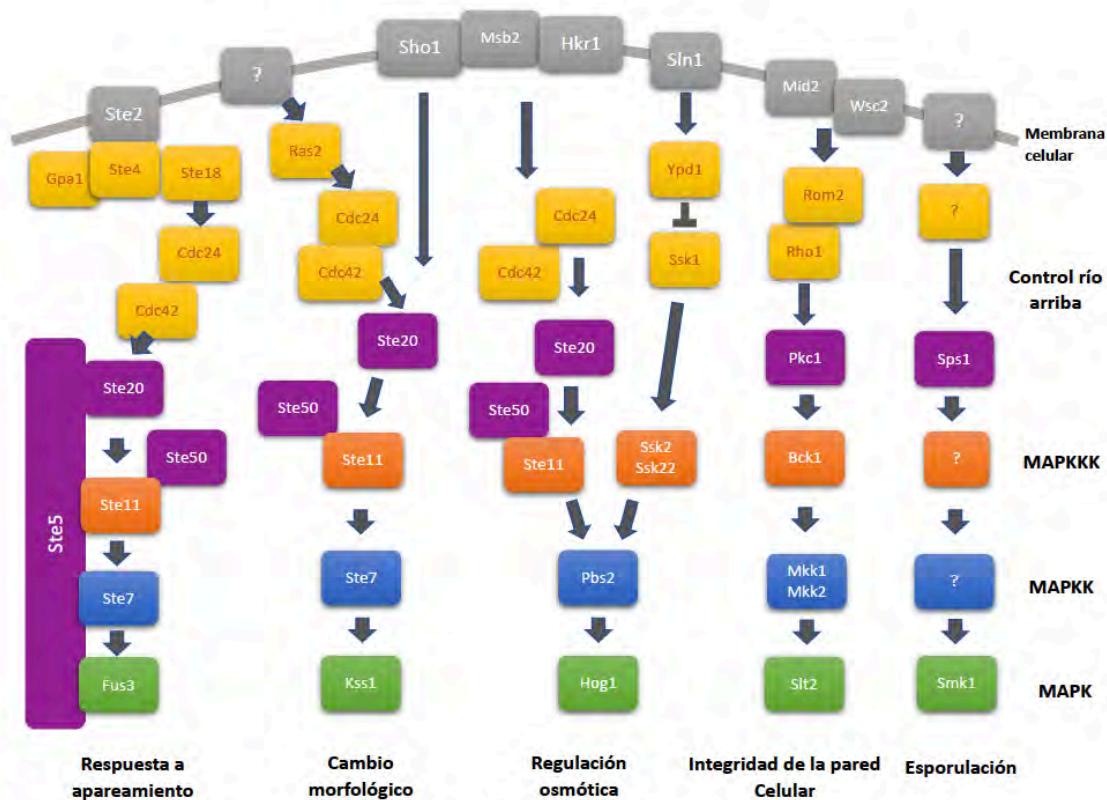


**Figura 1.4** Vías de MAP cinasas en mamíferos. La respuesta biológica a partir de un estímulo, se lleva a cabo a través de la señalización por cascadas de fosforilación sucesivas de las diferentes MAP cinasas. Una vez activada la última MAPK de la cascada, fosforila diferentes sustratos en el citosol y el núcleo para llevar a cabo cambios en la función proteica y la expresión génica que ejecuta la respuesta biológica adecuada. Tomado de Morrison, 2012.

Las MAPKs se unen establemente a sus sustratos y a las proteínas de andamiaje a través de múltiples dominios de anclaje (por ejemplo CD, *common docking domain* o dominio común de anclaje), distintos de sus sitios activos, los cuales pueden reconocer sitios homólogos en diferentes blancos. Son inactivadas por fosfatasas específicas: fosfatasas de tirosina y de serina/treonina.

Las MAPK activas frecuentemente se translocan del citoplasma al núcleo para fosforilar blancos nucleares además de poderse localizar en numerosas estructuras subcelulares, incluyendo microtúbulos, endosomas, retículo endoplásmico (RE) y el citoesqueleto de actina (Qi, 2005).

En las levaduras, existen cinco vías de MAP cinasas que utilizan seis MAPKs: las MAPKs Fus3 y Kss1 son muy similares a la vía de mamíferos ERK1/2; la vía de MAPK Hog1 es la equivalente a la vía de mamíferos p38; y las MAPKs Mpk1 (también conocida como Sl2), Mpl1 y Smk1. Fus3 y Kss1 regulan el apareamiento en respuesta a las feromonas de apareamiento peptídicas; Kss1 participa además en otra vía que regula el desarrollo/crecimiento pseudohifal y la integridad de la pared celular. Hog1 regula la osmolaridad intracelular, como se describirá más adelante; Mpk1 regula la integridad celular y la gemación en respuesta a cambios en la membrana plasmática o la pared celular por cambios mecánicos y Smk1 regula la esporulación, expresándose sólo después de que la meiosis se ha iniciado en respuesta a la privación de carbono y nitrógeno (Fig. 1.5). En suma, juegan un papel muy importante en la fisiología de la levadura, aunque algunas de ellas no son esenciales para la supervivencia de la célula. Las mutantes que carecen de todas las MAPKs crecen muy deficientemente y su reproducción sexual se bloquea (Qi, 2005).



**Figura 1.5** Diagrama esquemático de las vías de MAP cinasas en levaduras. *S. cerevisiae* tiene cinco vías MAPK: vías de respuesta a apareamiento, cambio morfológico, regulación osmótica, integridad de la pared celular y esporulación. La vía de osmorregulación de Hog1 se describe en detalle más adelante. Modificado de Rodríguez de Mier, 2011.

## 1.3.2 Estrés osmótico

Mantener el balance hídrico en las células es fundamental para su buen crecimiento y supervivencia. El estrés osmótico es entonces, la pérdida del equilibrio hídrico que puede ser tanto hiperosmótico como hipoosmótico. El estrés hiperosmótico se presenta como resultado del aumento en la concentración extracelular de solutos, ocasionando que el agua del interior celular salga para intentar alcanzar un equilibrio donde el potencial de agua interno sea igual al de la solución que la contiene; se ocasiona entonces la deshidratación y compactación celular y la pérdida de la presión de turgencia, mientras que en el estrés hipoosmótico, el potencial de agua es mayor en el medio que al interior de la célula, lo que ocasiona entonces, un aumento en el volumen celular.

### 1.3.2.1 Ósmosis, presión osmótica y osmolaridad

Cuando se colocan soluciones de distinta concentración, separadas por una membrana semipermeable (membrana que deja pasar las moléculas de disolvente pero no las de los solutos), las moléculas de disolvente pasan desde la solución con menor concentración de solutos a la de mayor concentración. A este fenómeno se le conoce como ósmosis, palabra que proviene del griego *osmos*, que significa "impulso". Al suceder la ósmosis, se crea una diferencia de presión en ambos lados de la membrana semipermeable: la presión osmótica. A través de esa membrana, el agua tenderá a moverse de un área de baja concentración de solutos a un área de alta concentración. Es importante enfatizar que la ósmosis ideal requiere sólo el movimiento del agua pura a través de la membrana sin ningún movimiento de partículas de soluto a través de la membrana semipermeable. La ósmosis puede todavía ocurrir con la permeabilidad de algunas partículas, pero el efecto osmótico se reduce mientras haya mayor permeabilidad a los solutos a través de la membrana semipermeable. El movimiento neto del agua será hacia el compartimiento con la mayor concentración de solutos. El compartimiento con la mayor concentración de solutos y la menor concentración de agua, será el que tenga la mayor presión osmótica (Lopez & Hall, 2020).

La presión osmótica, entonces, puede definirse como la presión que se debe aplicar a una solución para detener el flujo neto de disolvente a través de una membrana semipermeable. La presión osmótica es una de las cuatro propiedades coligativas de las soluciones (junto con el descenso crioscópico, el ascenso ebulloscópico y el descenso de la presión de vapor) y depende del

número de partículas en disolución, sin importar su naturaleza. Es una de las características principales en las relaciones de los líquidos que constituyen el medio interno de los seres vivos, ya que la membrana plasmática regula la entrada y salida de soluto al medio extracelular que la rodea, ejerciendo como barrera de control.

En cuanto a la unidad de medida, la osmolaridad es la concentración de las partículas osmóticamente activas de un soluto contenidas en una disolución, expresada en osmoles (Osm) o en miliosmoles (mOsm) por litro de disolvente.

### 1.3.2.2 Estrés hiperosmótico

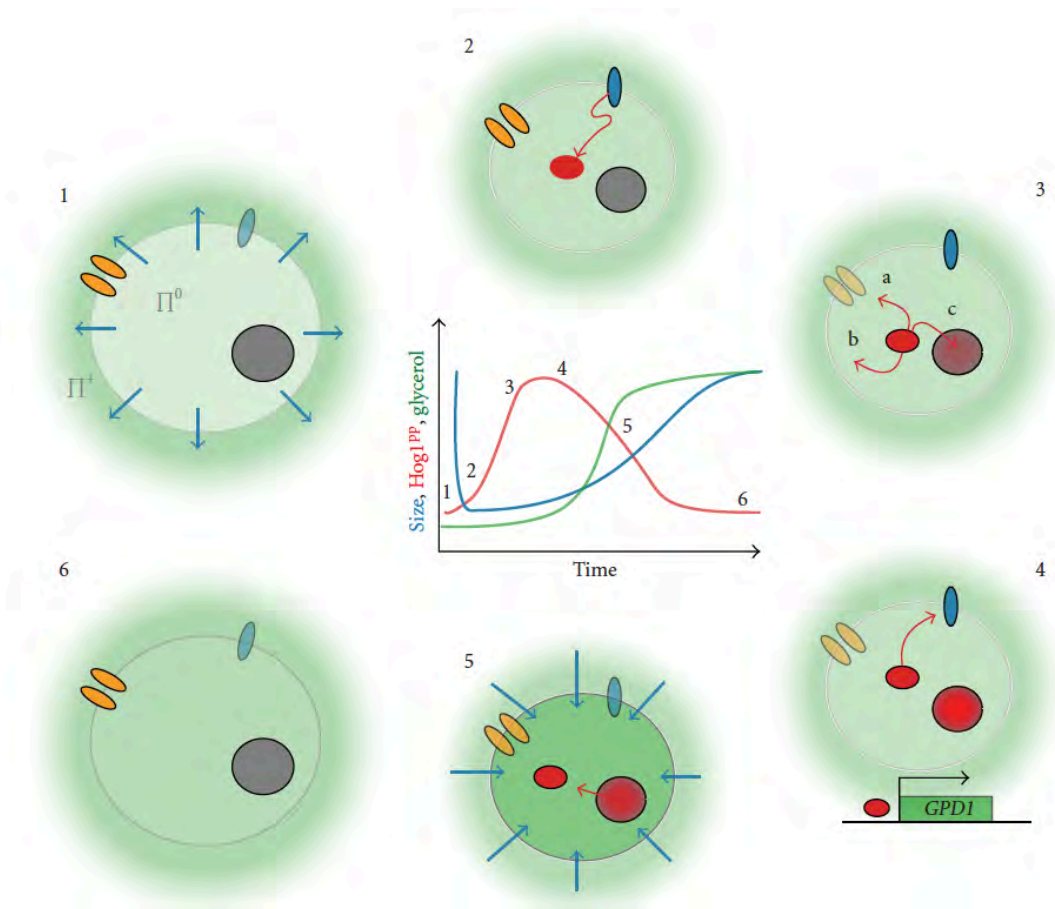
En *S. cerevisiae* Mager y Siderius en 2002 describieron las diferentes fases de respuesta a la hiperosmolaridad, sintetizadas en la [figura 1.6](#):

i) Como una consecuencia inmediata a la exposición a alta osmolaridad en el medio, las células pierden agua rápidamente, lo que lleva a la pérdida de la turgencia y con ello, la disminución del volumen celular. Intracelularmente, el agua es reclutada desde la vacuola al citoplasma, compensando parcialmente el repentino incremento en la concentración (macro)molecular. Además, dependiendo de la severidad del estrés osmótico, el citoesqueleto se colapsa, dando lugar a la despolarización de los filamentos de actina. Estos eventos inmediatos son causados por las fuerzas físico-mecánicas que operan bajo las condiciones hiperosmóticas.

ii) La respuesta primaria al estrés hiperosmótico consiste en algunos eventos moleculares por los cambios celulares repentinos. Primero, las células arrestan su crecimiento. El arresto en la progresión del ciclo celular seguramente es parte de un mecanismo estratégico para ajustarse apropiadamente a las nuevas condiciones de crecimiento. En segundo lugar, el canal de glicerol Fps1 se cierra. El glicerol es el más importante soluto compatible de *Saccharomyces*. Por la acumulación de glicerol interno, las células logran recuperar la turgencia. En tercer lugar, se activa la vía de MAP cinasas HOG1 (que se describe a detalle más adelante), estimulando la síntesis de glicerol entre otras muchas cosas. El activador transcripcional Hot1 es un sustrato de Hog1. Hot1 regula la transcripción del gen *GPD1* que codifica para la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Rep, Albertyn, Thevelein, Prior, & Hohmann, 1999). Entonces, además de prevenir la salida de glicerol, como se dijo antes, incrementar su síntesis contribuye a su acumulación. Entender la biosíntesis de glicerol y su acumulación tiene una relevancia comercial muy importante, para controlar el desempeño de las

levaduras en la preparación de masa para panadería o en la fermentación de vinos y cerveza.

iii) La fase sostenida de la respuesta, generalmente hablando, es la suma de los procesos metabólicos evocados en la fase primaria de la respuesta. De hecho, el perfil genómico de transcritos ha revelado que la expresión génica se restituye a un nuevo estado estable (Rep et al., 2000). Lo mismo sucede con los niveles celulares de actividades reguladoras y metabólicas. El glicerol intracelular se acumula por los efectos combinados del incremento en su síntesis y disminución de su salida. Cuando se alcanza el tamaño adecuado de la célula, se continúa con el crecimiento y las células continúan dividiéndose. Se repara el citoesqueleto y se repolariza la actina. Interesantemente, la organización de la pared celular se ajusta a las nuevas circunstancias ambientales (Mager & Siderius, 2002).



**Figura 1.6** Secuencia de la respuesta de la adaptación de las levaduras al estrés hiperosmótico. En el centro de la figura se representa una gráfica con la variación del tamaño (línea azul), fosforilación de Hog1 (línea roja) y la concentración interna de glicerol (línea verde). (1) Después

de un incremento en la osmolaridad externa (sombra verde), se pierde rápidamente agua como una respuesta rápida mecánica (flechas azules). (2) Los osmosensores de la vía HOG (en azul) activan la vía y ello conlleva a la fosforilación de Hog1. (3) Hog1 fosforilado (óvalo rojo) induce algunos procesos: (a) Inactivación del canal de glicerol Fps1 previniendo salida de glicerol; (b) Activación directa o indirecta de efectores citoplásmicos, por ejemplo, la 6-fosfofructo-2-cinasa (Pfk2) involucrada en la síntesis de glicerol; (c) translocación hacia el núcleo. Se debe recordar que hay otros blancos de Hog1 como Nha1 y Tok1. (4) Hog1 fosforilada induce un cambio transcripcional importante, en particular, incrementando la expresión del gen *GPD1* que lleva a la síntesis de glicerol. (5) El incremento en la concentración interna de glicerol lleva a la entrada de agua a la célula y progresivamente a la recuperación del volumen celular, mientras que Hog1 es exportado del núcleo; (6) La vía se apaga y la presión de turgencia y el tamaño celular se recuperan. La célula está adaptada a su nuevo ambiente. Tomado de (Miermont, Uhlenhof, McClean, & Hersen, 2011).

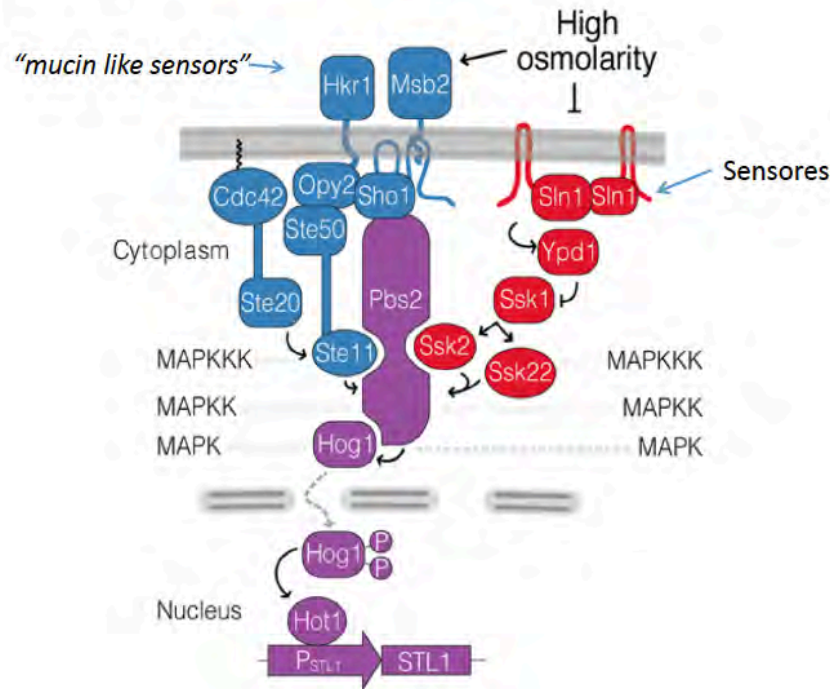
### 1.3.2.3 Activación de la vía HOG (High Osmolarity Glycerol response)

Una de las estrategias más importantes de los organismos halotolerantes para lidiar con el estrés hiperosmótico es el mantenimiento de la concentración intracelular de solutos compatibles, ya sea sintetizándolos o tomándolos del exterior mediante transportadores especiales (Lages et al., 1999). En *D. hansenii*, como en otras levaduras, el glicerol es el osmolito más importante (L. André, Nilsson, & Adler, 1988; Gustafsson & Norkrans, 1976; Larsson, Morales, Gustafsson, & Adler, 1990), sin embargo, es capaz de sintetizar trehalosa o arabinitol en altas concentraciones de NaCl (Adler & Gustafsson, 1980; Blomberg & Adler, 1992; J. C. González-Hernández, Jiménez-Estrada, & Peña, 2005).

La activación de los complejos mecanismos de osmorregulación depende de vías de transducción de señales. En *D. hansenii* se ha propuesto que la acumulación, transporte de iones y la síntesis de solutos compatibles, dependen de la vía HOG (High Osmolarity Glycerol response) (Fig. 1.7). La vía HOG consiste en una cascada de MAP cinasas activadas por mitógenos (MAPKs, descritas en la sección 1.3.1) que en este caso media la adaptación de las células al estrés hiperosmótico. La activación de esta vía ocasiona la fosforilación transitoria de la MAPK Hog1. Hog1 fosforilada se transloca rápidamente al núcleo, lo que resulta en la transcripción de genes blanco. Esta vía parece ser ubicua en diferentes géneros de levaduras; en *D. hansenii* se le ha identificado también y se ha reportado que se activa por alta osmolaridad, estrés oxidante y luz UV, pero no por estrés térmico, manteniendo a Hog1 fosforilada en el citoplasma durante el crecimiento en estas condiciones (Sharma et al., 2005).

El incremento en la osmolaridad extracelular resulta en la inducción de la expresión de genes de protección al estrés. Uno de los efectos es la acumulación intracelular de glicerol, por la activación de la vía de MAP cinasas Hog1. Como se ha comentado anteriormente, las MAP cinasas juegan un papel clave en la regulación de la respuesta al estrés en muchos organismos, desde las levaduras hasta los mamíferos.

En *S. cerevisiae*, la vía Hog1 se activa por dos osmo-sensores independientes: las ramas de SLN1 y de SHO1. La rama de SLN1 es un sistema de fosforrelevo parecido al de procariontes e incluye a las proteínas Sln1, Ypd1, Ssk1 y las proteínas redundantes Ssk2 y Ssk22 (Figs. 1.7 y 1.8). Sln1 es una histidina cinasa sensible a los cambios en la turgencia de la membrana que resultan del osmoestrés; en condiciones normales, o en condiciones de bajo estrés osmótico, se autofosforila y transfiere el grupo fosfato de su histidina 576 a Ypd1 que es una proteína intermediaria de fosfotransferencia, la cual a su vez lo transfiere a un residuo de aspártico de Ssk1 (regulador de respuesta).



**Figura 1.7** Modelo de la vía HOG1 en *S. cerevisiae*. El cambio en la osmolaridad es detectado por los sensores tipo mucinas Hkr1 y Msb2 para la rama Sho1 (en azul) y por Sln1 para la rama del mismo nombre (en rojo). La señal es transferida a través de fosforilaciones sucesivas hasta llegar a Pbs2 que finalmente fosforila a la MAPK Hog1; con ello, migra al núcleo para estimular la transcripción de genes de respuesta a estrés osmótico (en morado). Para más detalles, referirse al texto. Modificado de Dunayevich et al., 2018.

En condiciones hiperosmóticas, se inhibe la actividad de cinasa de Sln1 y se induce la acumulación de Ssk1 no fosforilado, el cual, bajo estas condiciones, se une por medio de su extremo carboxilo al extremo amino de alguna de las proteínas redundantes Ssk2/Ssk22 (MAPKKK) en su dominio autoinhibitorio; con ello, se estimula su autofosforilación lo que las activa, y cualquiera de ellas puede entonces, liberarse de su dominio autoinhibitorio y unirse y fosforilar a la MAPKK Pbs2 en una histidina, que eventualmente activa por fosforilación a Hog1. Las levaduras carentes de la proteína Sln1, no tienen la capacidad de activar la vía en el resto de la cascada, sin embargo, lo que lleva a las levaduras a la letalidad es la auto-activación de Ssk2/Ssk22 en exceso (Yamamoto, Tatebayashi, & Saito, 2016).

La otra rama de respuesta al estrés hiperosmótico es la rama de SHO1, que es la encargada de responder a estímulos de más alta osmolaridad. Ésta es una proteína osmosensora con 4 hélices transmembranales en su extremo amino terminal y un dominio SH3 (*Src Homology 3*) en su extremo carboxilo mediante el cual recluta a la membrana plasmática a la MAPKK Pbs2 uniéndose a un motivo rico en prolinas, sin activarla directamente. Durante el osmoestrés, se activa a la MAPKKK Ste11, que secuencialmente activa a Pbs2 y ésta, finalmente a Hog1 (Fig. 1.7). Entonces, Pbs2 y Hog1 son comunes a las dos ramas. La rama SHO1 se puede subdividir en las sub-ramas: MSB2 y HKR1 (Fig. 1.8).

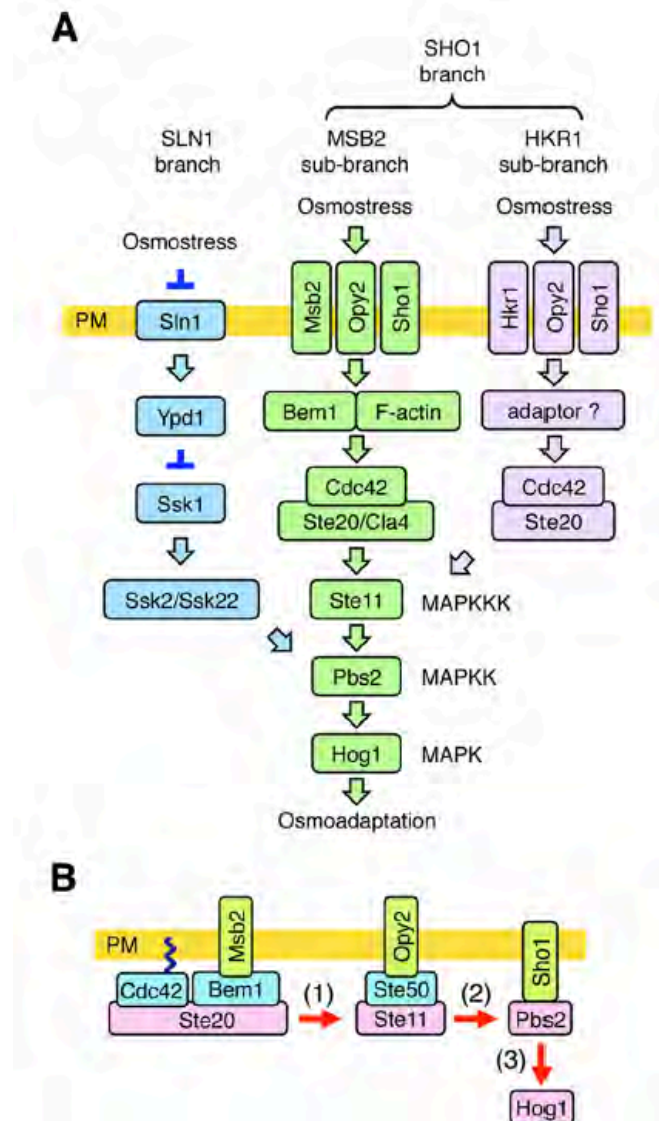
Msb2 y Hkr1 son glicoproteínas transmembranales de tipo mucina, consideradas como osmosensoras. Aunque Msb2 ha sido implicada con la osmorregulación, el papel de Msb2 en la vía HOG no es todavía totalmente claro. Mutantes carentes de Msb2 y Hkr1 en un fondo genético *ssk2/22Δ*, inhiben completamente la activación de Hog1, indicando que Hkr1 y Msb2 son funcionalmente redundantes (Yamamoto et al., 2016).

En la Fig. 1.8B se muestra cómo se activa Hog1 a través de la sub-rama MSB2. Las cinasas que se activan consecutivamente en la cascada de MAPK Ste20, Ste11 y Pbs2 son reclutadas del citoplasma a la membrana plasmática por las proteínas transmembranales Msb2, Opy2 y Sho1, respectivamente. Estas proteínas transmembranales entonces, concentran a las cinasas citoplásmicas en la membrana plasmática para facilitar su interacción.

Los 4 dominios transmembranales de Sho1 tienen múltiples funciones. Primero, Sho1 se homodimeriza a nivel de la interfaz TM1/TM4 (región transmembranal 1 con la 4) y homotrimeriza en la interfaz TM2/TM3. Por dimerizaciones y trimerizaciones reiterativas, Sho1 forma entonces grandes oligómeros planos. Segundo, la interfaz TM1/TM4 del oligómero de Sho1 se une a Opy2p. Tercero, la interfaz TM2/TM3 del oligómero de Sho1 se une a Hkr1 y



también a Msb2. Finalmente, los 4 dominios TM de Sho1 se unen a Ste50 cuando hay osmoestrés presente. Ste50 es una proteína adaptadora citoplásmica que une simultáneamente a Ste11 y a Opy2 (Fig. 1.8B). Entonces, la interacción entre Sho1-Ste50, parece apoyar la función osmosensora de Sho1 (Yamamoto et al., 2016). Opy2 recluta al complejo Ste50/Ste11 hacia la membrana plasmática y ésta es una de sus funciones principales. Opy2 participa además, en la señalización del crecimiento filamentoso en la vía de MAPK Kss1.



**Figura 1.8** Modelo esquemático de la vía HOG. (A) En verde: proteínas de la sub-rama MSB2; en azul: proteínas de la rama SLN1; en lavanda: proteínas involucradas en la sub-rama HKR1. Las proteínas separadas por una diagonal son funcionalmente redundantes. La barra amarilla representa a la membrana plasmática (PM). Las flechas indican activación, mientras que las T invertidas representan inhibición. (B) Modelo simplificado de la sub-rama MSB2 de la vía HOG. Las flechas rojas indican el flujo de la señal por fosforilación. Tomado de Yamamoto et al., 2016.

La tercera proteína de la sub-rama MSB2 es precisamente Msb2, que es una proteína de una sola hélice TM de 1,306 residuos de aminoácidos, cuya región extracelular contiene un dominio rico en serinas y treoninas (región STR) que está fuertemente glicosilado (Tatebayashi et al., 2007). La remoción de la región STR, ya sea por delección o por proteólisis, convierte a Msb2 en una proteína inactiva. La región citoplásmica de Msb2 interactúa funcionalmente con la proteína de andamiaje Bem1. Bem1 se une entre otras proteínas a Ste20 y a su activador la GTPasa Cdc42; entonces, Msb2 recluta a la membrana a Ste20 (Yamamoto et al., 2016) (Fig. 1.8B).

La interacción de Msb2 con Opy2 es esencial para la activación de Hog1 debido al estrés osmótico a través de la sub-rama MSB2. La interacción es debida a uniones disulfuro entre las 2 proteínas, a través de un motivo extracelular de 8 cisteínas en Opy2, que favorecen su función como proteínas sensoras; el osmoestrés ocasiona cambios estructurales en este complejo proteico.

El mecanismo de señalización a través del cual Hkr1 o Msb2 estimulan la cascada Hog1 es específico para cada osmosensor. Específicamente, la activación de Hog1 por Msb2 requiere además de Bem1 como proteína de andamiaje al citoesqueleto de actina. El citoesqueleto de actina se reorganiza rápidamente después de la exposición de las células al osmoestrés; se ha reportado ya la participación de la actina filamentosa (F-actina) en la respuesta al estrés hiperosmótico (Brewster & Gustin, 1994); sin embargo, el dominio citoplásmico de Hkr1 también contribuye a la activación de Ste11 por Ste20, pero a través de un mecanismo que no involucra ni a Bem1 ni al citoesqueleto de actina. Se ha descrito un motivo PXXP en Ste20 que se une específicamente al dominio SH3 de Sho1, y esta interacción entre Ste20 y Sho1 contribuye a la activación de la cascada Hog1 por Hkr1, pero no por Msb2 (Tanaka et al., 2014). Estas diferencias entre Hkr1 y Msb2 podrían permitir una regulación diferencial entre las dos proteínas y proveer de un mecanismo a través de Msb2 para conectar la regulación del citoesqueleto con la respuesta al estrés osmótico (Tanaka et al., 2014).

La activación de Ste11 (MAPKKK), lleva a la fosforilación de Pbs2 (MAPKK), que no sólo tiene la función de MAP cinasa, sino que es también una importante proteína de andamiaje, y ésta finalmente, activa a Hog1 (MAPK). Pbs2 tiene un sitio de acoplamiento para Hog1 en su extremo C-terminal y fosforila a Hog1 en el motivo TGY (Treonina-Glicina-Tirosina, del asa de activación) en las posiciones 174-176 de la proteína. Esto induce la translocación de Hog1 al núcleo (Ferrigno, Posas, Koepp, Saito, & Silver, 1998), donde induce diversas respuestas al estrés, que incluyen la síntesis y acumulación de glicerol como osmolito compatible (siguiente sección), el arresto transitorio del ciclo celular y cambios en

la expresión de genes de osmo-respuesta (Saito & Posas, 2012; Vázquez-Ibarra et al., 2018).

Esta vía, como muchas otras de gran relevancia para la célula, requiere de circuitos regulatorios muy estrictos para prevenir su hiperactivación, tanto en duración como en intensidad. La vía HOG, no es la excepción, ya que cuenta con un sistema de regulación finamente ajustado por circuitos de retroalimentación positiva y negativa, que permiten una respuesta precisa al estímulo, con la duración y el apagamiento adecuados.

Una vez que la célula se recupera del estrés por medio del balance osmótico, Hog1 es desfosforilado y exportado de nuevo al citoplasma. La desfosforilación de Hog1 se lleva a cabo por medio de dos tipos de fosfatasa de proteínas: las PTPs desfosforilan a la Tirosina-176 e incluyen a Ptp2 y Ptp3, y las PTCs desfosforilan a la Treonina-174 e incluyen a Ptc1, Ptc2 y Ptc3 (Fig. 1.9e) (Mattison & Ota, 2000; Vázquez-Ibarra et al., 2020).

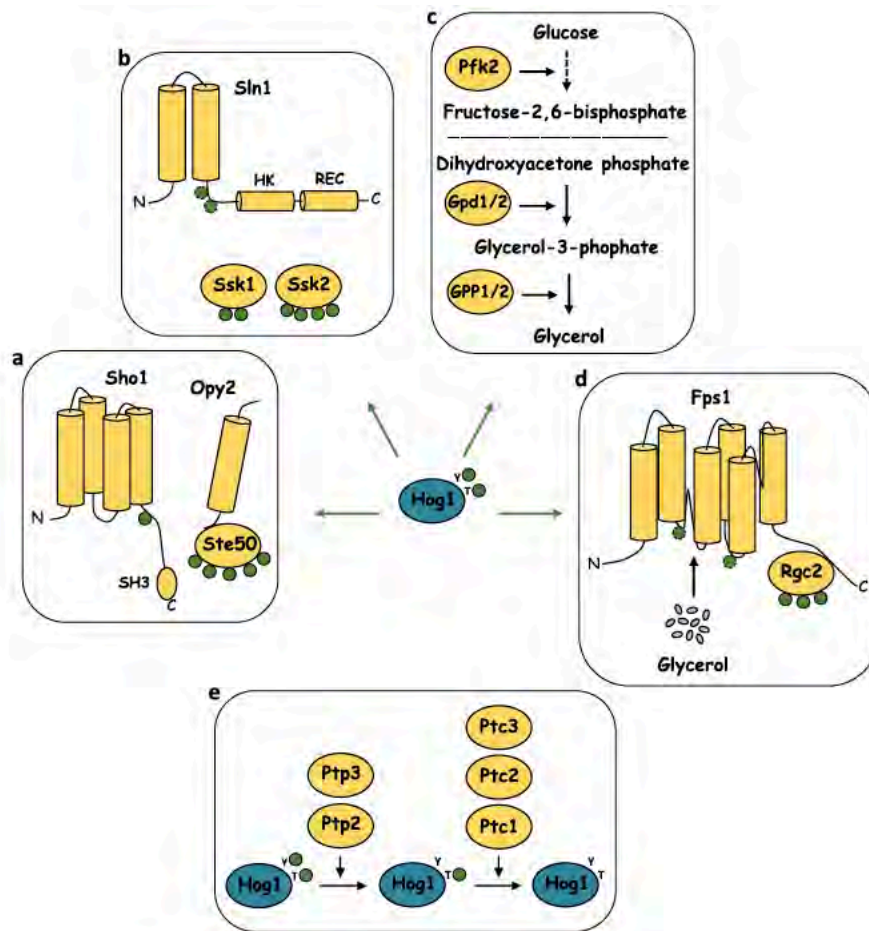
Hog1 a su vez regula negativamente la vía HOG fosforilando a Sho1 y a Ste50 (Fig. 1.9a) (Saito & Posas, 2012). Hog1 activado directamente fosforila a la Serina-166 de la proteína Sho1, lo que afecta su oligomerización y con ello, disminuye la activación de Hog1. Además, Hog1 activado también fosforila 5 residuos en la proteína adaptadora Ste50, que atenúa la vía HOG disminuyendo su afinidad por la proteína de anclaje membranal Opy2. Otro punto de retroalimentación negativa activada por Hog1 es disminuyendo la interacción entre Ste11 y Msb2, y con ello, la formación del complejo osmo-sensor.

Hog1 tiene cierta actividad basal en condiciones iso-osmóticas, que es mediada por la rama Sln1. Dentro de esta rama, son blancos de fosforilación de Hog1: Sln1, Ssk1 y Ssk2 (Fig. 1.9b). La fosforilación en Sln1 se lleva a cabo en una región entre el motivo de histidina cinasa y la segunda hélice transmembranal; hecho que al parecer no interfiere con la actividad basal de Hog1, todavía falta dilucidar a profundidad, esta actividad de Hog1 sobre Sln1 (Vázquez-Ibarra et al., 2020).

La biosíntesis de glicerol se describe a detalle en la siguiente sección (1.3.2.4), pero aquí se incluye la función de Hog1 en este proceso como un mecanismo de control. Algunas enzimas clave para la producción y acumulación de glicerol son reguladas por la actividad citosólica de Hog1. Hog1 fosforila a la Pfk2 (6-fosfofructo-2-cinasa), en respuesta a alta osmolaridad; el aumento en la síntesis de fructosa-2,6-bisfosfato, activa la vía glucolítica (Fig. 1.9c). Hog1 también modula la producción de glicerol incrementando el flujo metabólico de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a glicerol, incrementando la actividad de las

glicerol-3-P deshidrogenasas Gpd1 y Gpd2 (Fig. 1.9c). El incremento en la concentración interna de glicerol también puede ser debido al rápido cierre del canal de exportación de glicerol Fps1 (Fig. 1.9d) (Tamás et al., 2002); la hiperosmolaridad induce su cierre, mientras que las condiciones hipoosmóticas favorecen su apertura. Fps1 es regulado por Rgc2 (*Regulator of glycerol channel*) y posiblemente por su parálogo redundante Rgc1. Bajo estrés hiperosmótico, Hog1 se une directamente al dominio regulatorio en el extremo N-terminal de Fps1 y fosforila a Rgc2 en varios sitios, liberándolo de su unión al extremo C-terminal de Fps1, permitiendo el cierre del canal (Lee et al., 2013).

A largo plazo, Hog1 modula la respuesta transcripcional que mantiene elevada la producción de glicerol hasta que se equilibra a través de la membrana celular, lo que entonces induce una disminución en la actividad de Hog1 (Hohmann, 2002; Saito & Posas, 2012; Schaber, Baltanas, Bush, Klipp, & Colman-Lerner, 2012).



**Figura 1.9** Diagrama de los circuitos de retroalimentación negativa que regulan la vía HOG. Panel a: proteínas que pertenecen a la rama Sho1; panel b: rama Sln1; panel c: producción enzimática de glicerol; panel d: acuagliceroporina Fps1. Los elementos que son blanco para la

actividad de Hog1 se señalan con flechas verdes. En el panel e, se esquematiza separadamente la actividad de las fosfatasas de Hog1. Los círculos verdes representan a los fosfatos. Tomado de Vázquez-Ibarra et al., 2020.

El estrés osmótico tiene además, un alto impacto en la fisiología de la célula como la reorganización del citoesqueleto, cambios en la dinámica de la pared celular, ajustes metabólicos y arresto celular, así como modulación de la transcripción.

En respuesta al estrés, las vías de transducción de señales controlan la expresión génica por medio de la regulación coordinada de varios pasos durante la biogénesis de mRNA; desde la dinámica de la cromatina, la iniciación de la transcripción, la elongación del mRNA y su modificación, estabilidad y exportación.

Colectivamente, estos procesos permiten que la producción de proteínas en respuesta al estrés sea rápida y coordinada.

La mayor parte de las investigaciones sobre estrés salino han sido realizadas en *S. cerevisiae*. La vía HOG1 está presente en *D. hansenii*, pero todavía se conoce poco de ésta. Cuando el gen *DhHOG1* se expresa de forma heteróloga en una cepa de *S. cerevisiae hog1Δ*, le confiere la capacidad de crecer bajo estrés hiperosmótico y de inducir la sobreproducción de glicerol (Bansal & Mondal, 2000). Este mismo grupo estudió la localización subcelular de *DhHog1* después de un tratamiento hiperosmótico y observaron que *DhHog1* fosforilada tiene una entrada tardía al núcleo en *D. hansenii* (con respecto a lo que ocurre en *S. cerevisiae*) luego es exportada de nuevo al citoplasma en estado fosforilado tras un estrés salino severo. En este estudio, también vieron que la luz UV y el estrés oxidante inducen adicionalmente la fosforilación de *DhHog1* (Sharma et al., 2005). El gen *DhPBS2* (que codifica para la MAP2K Pbs2) es capaz de complementar parcialmente una mutante *pbs2Δ* de *S. cerevisiae* (Sharma & Mondal, 2005), confirmando la funcionalidad y equivalencia de la vía en *D. hansenii*.

#### 1.3.2.4 Biosíntesis y transporte de glicerol

La osmoregulación involucra procesos homeostáticos que aseguran un volumen celular apropiado, forma y turgencia, así como un medio intracelular óptimo para los diversos procesos bioquímicos. Estudios recientes demuestran que las levaduras pueden operar dentro de una ventana muy estrecha de concentraciones de agua que permiten la difusión rápida de biomoléculas, mientras que la compactación celular que se presenta como resultado de un estrés hiperosmótico, da lugar a un aglomeramiento macromolecular y una desaceleración de los procesos celulares.

El balance osmótico que se requiere por exposición a un medio hiperosmótico se puede obtener por la síntesis o captación de solutos compatibles. Éstos son típicamente componentes de bajo peso molecular, altamente solubles en agua, sin carga, o zwitteriónicos a un pH fisiológico. Existe una gran variedad de solutos compatibles entre los que se encuentran los polioles, como el glicerol y el arabinol, los azúcares como la sacarosa y la trehalosa y la glicina betaína, que es un derivado de una amina cuaternaria (González-Hernández & Peña, 2002).

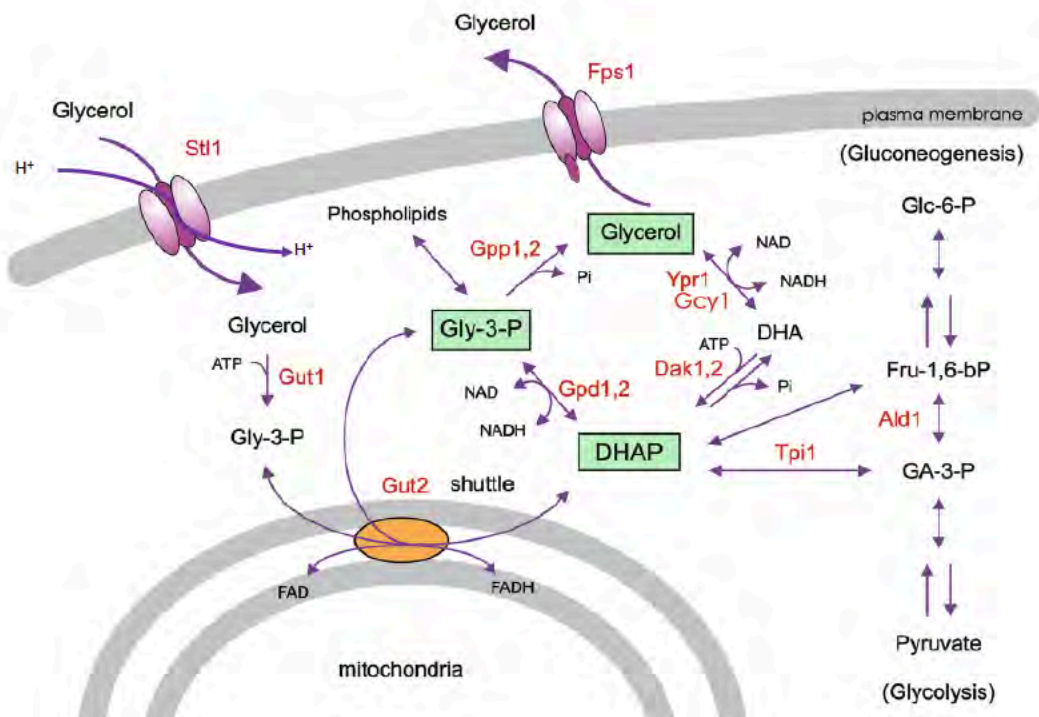
Las levaduras acumulan glicerol como osmolito compatible bajo estrés hiperosmótico para ganar volumen celular y turgencia y liberan glicerol al medio después de un choque hipoosmótico. La captación activa de glicerol es uno de los procesos más importantes que caracterizan a las especies halotolerantes (Lages et al., 1999). El glicerol se puede usar como fuente de carbono y energía, forma parte del esqueleto de los fosfolípidos y triacilgliceroles, constituyentes comunes de las membranas celulares y lípidos de reserva respectivamente. La razón principal por la que las células producen y acumulan glicerol intracelularmente es por sus propiedades protectoras en contra del estrés, particularmente el hiperosmótico, pero también durante el estrés térmico. El contenido intracelular de glicerol en algunos hongos y algas puede alcanzar el increíble nivel de 7-8 M (Klein, Swinnen, Thevelein, & Nevoigt, 2017).

De hecho, en *D. hansenii*, como en muchas especies de levaduras, el glicerol es el soluto compatible favorito (L. André et al., 1988; Gustafsson & Norkrans, 1976; Larsson et al., 1990); sin embargo, *D. hansenii* también puede producir eficientemente trehalosa o arabinol como solutos compatibles a altas concentraciones de sal (Blomberg & Adler, 1992; González-Hernández et al., 2005; Larsson et al., 1990). El nivel intracelular de glicerol depende de su síntesis, utilización y transporte y responde a varios tipos de estrés de solutos además del salino, por ejemplo, KCl, sacarosa o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (L. André et al., 1988; M. L. Neves et al., 1997).

La vía de respuesta HOG controla la acumulación de glicerol a varios niveles, donde cada mecanismo contribuye a la recuperación del volumen celular. En primera instancia y de manera rápida: se inhibe la salida de glicerol, se activa directamente la primera enzima de la biosíntesis de glicerol, se estimula el flujo glucolítico, y en una segunda estrategia a largo plazo: Hog1 directamente estimula la expresión de los genes que codifican para las enzimas de la biosíntesis y absorción activa del glicerol (Hohmann, 2015).

El glicerol es producido a partir del intermediario glucolítico dihidroxiacetona fosfato (DHAP), reacción catalizada por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa NAD<sup>+</sup>-

dependiente Gpd1 y Gpd2 y la glicerol-3-fosfatasa, Gpp1 y Gpp2. Hay una ruta alternativa vía la DHAP, sin embargo, este proceso no parece tener un papel significativo bajo el estrés osmótico. El glicerol es fosforilado por la glicerol cinasa Gut1 y oxidado por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial FAD-dependiente a DHAP, permitiendo su entrada a la glucólisis/ gluconeogénesis. La producción de glicerol y su utilización probablemente no ocurren simultáneamente, porque la vía de utilización es reprimida por la glucosa (Hohmann, 2015) (Fig. 1.10).



**Figura 1.10** Metabolismo del glicerol en levaduras. Se muestra la producción de glicerol a partir del intermediario glucolítico dihidroxiacetona fosfato (DHAP), su exportación a través del canal Fps1 y la captación por el simportador con protones Stt1, así como las enzimas involucradas en su síntesis y utilización. Modificado de Hohmann, 2015.

En la fermentación alcohólica normal, el glicerol se produce inicialmente en respuesta a un osmoestrés por la alta concentración de azúcares en el mosto. En etapas más tardías de la fermentación, cuando no hay oxígeno presente y entonces la respiración no puede ser usada para la reoxidación del NADH, parte de este se reoxida vía la producción de glicerol a partir de la DHAP. Esto es

necesario porque algunos de los intermediarios glucolíticos son usados para las vías biosintéticas y entonces no hay suficiente piruvato disponible para reoxidar al NADH vía la producción de etanol.

Durante el crecimiento de *S. cerevisiae* en glicerol como única fuente de carbono, su captación se lleva a cabo únicamente por un simportador glicerol/ H<sup>+</sup> codificado por el gen *STL1* (Ferreira et al., 2005); la delección de *STL1* abate por completo la internalización de glicerol, así como el crecimiento en esta fuente de carbono. En el estrés osmótico, la transcripción de *STL1* se induce transitoriamente durante la fase exponencial de crecimiento en medio con glucosa (Ferreira et al., 2005; Posas et al., 2000; Rep et al., 2000), sin embargo, esta captación activa de glicerol inducida por osmoestrés parece ser reemplazada subsecuentemente por un incremento en la producción intracelular de glicerol y por su retención dentro de la célula debida al cierre del canal Fps1 que previene el eflujo del glicerol, evento que también es controlado por Hog1 (Tamás et al., 2002).

Se ha comprobado que la función principal del canal Fps1 en *S. cerevisiae* es controlar la exportación de glicerol durante la osmorregulación (Tamás et al., 2002) y se ha cuestionado el concepto generalizado de que el glicerol es capaz de atravesar la bicapa lipídica de la membrana plasmática por difusión pasiva dirigida únicamente por su gradiente de concentración (Klein et al., 2017).

En *D. hansenii*, las principales vías metabólicas (Adler, Blomberg, & Nilsson, 1985; L. André et al., 1988), así como los sistemas de transporte — descritos en la sección 1.2.1.2— (Klein et al., 2017; Lages et al., 1999; L. Neves, Oliveira, & Lucas, 2004) involucrados en el metabolismo de glicerol, son similares a los presentes en *S. cerevisiae* (Figs. 1.2 y 1.10), con la excepción del simportador Na<sup>+</sup>/glicerol en *D. hansenii*, que puede usar también iones potasio para internalizar glicerol (Lucas et al., 1990).

Bajo estrés hiperosmótico, la síntesis de glicerol en *S. cerevisiae*, así como en otras células eucariontes, está controlada principalmente por la vía HOG. *DhGPD1*, el gen que codifica para la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, que cataliza el primer paso de la síntesis de glicerol, fue también identificado, aislado y expresado en una cepa *gpd1Δ* de *S. cerevisiae*. Se encontró que el estrés hiperosmótico activó la transcripción del gen *DhGPD1*, restaurando la producción de glicerol en la cepa *Scgpd1Δ*, respondiendo a la inducción llevada a cabo por SchHog1 nativa (Thomé, 2004, 2005; Thomé & Trench, 1999). Además, se analizó la regulación de los genes *DhGPD1* y *DhGPP2* en comparación con los ortólogos de *S. cerevisiae* crecida bajo diferentes concentraciones de NaCl y se confirmó que esos genes están regulados a la alza bajo estrés hiperosmótico y que tienen

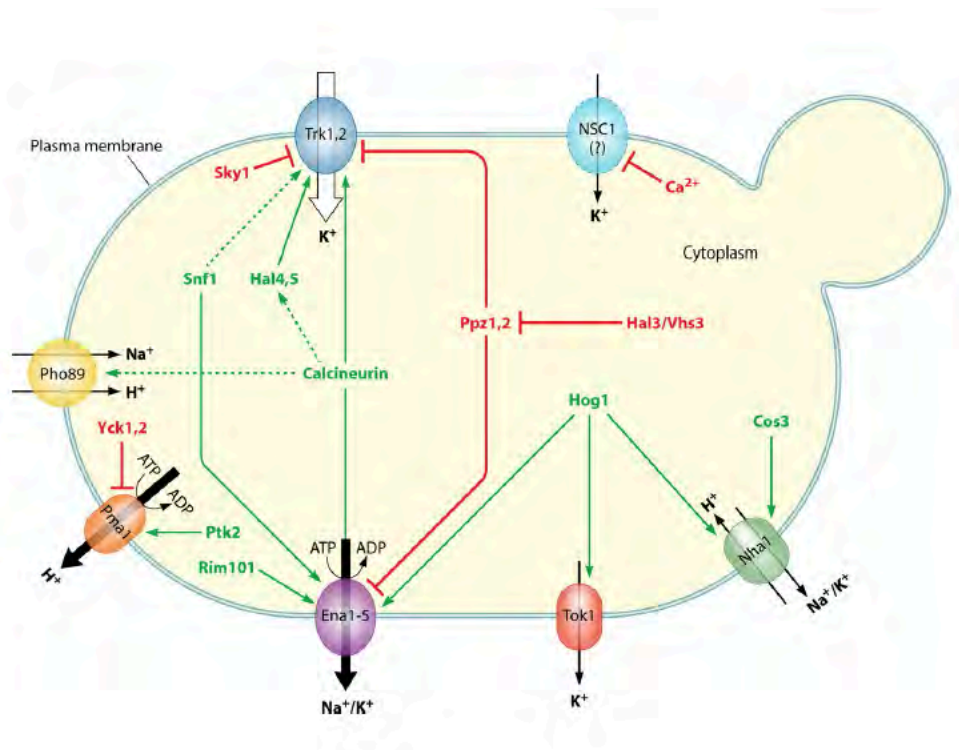


un papel significativo para la tolerancia a NaCl en *D. hansenii* (Gori, Mortensen, Arneborg, & Jespersen, 2005).

### 1.3.2.5 Regulación de la homeostasis iónica en el estrés osmótico

El trabajo que se ha hecho a este respecto ha sido también realizado principalmente en *S. cerevisiae*. Se sabe que las vías de señalización conservadas, calcineurina y HOG participan en la regulación de los procesos de entrada y salida de iones a nivel de la membrana plasmática, aunque los detalles moleculares todavía no se conocen a detalle.

La vía HOG tiene varios blancos relevantes: Nha1, Tok1 y Ena1, transportadores cuya función en la homeostasis iónica se ha explicado anteriormente (sección 1.2.1.2). Un blanco en particular puede integrar múltiples señales que definen su comportamiento específico; por ejemplo, Ena1-5 puede integrar señales de HOG1, calcineurina y otras señales. Esta red de interacciones funcionales de señalización se esquematiza en la figura 1.11.



**Figura 1.11** Red funcional integral de señalización que regula la homeostasis iónica a nivel de membrana plasmática en *S. cerevisiae*. En verde, las vías que activan a los transportadores y en rojo se muestra la inhibición de la función. Tomado de Ariño, Ramos, & Sychrová, 2010.

Bajo un choque osmótico, la cinasa Hog1 se activa por la vía HOG (descrita en la sección 1.3.2.3) y rápidamente fosforila al transportador  $Na^+/K^+-H^+$  Nha1 en

su extremo C-terminal citosólico (presumiblemente en las posiciones T-765 y T-876), disminuyendo así la concentración intracelular en exceso del catión tóxico Na<sup>+</sup>. Este evento de fosforilación cambia la actividad de Nha1 por un mecanismo todavía desconocido, pero se ha propuesto que es necesario para la reasociación de la maquinaria transcripcional y con ello, se estimula la transcripción de *ENA1* encargada de expulsar el resto del Na<sup>+</sup> a expensas de ATP (Proft & Struhl, 2004). Estos mismos autores muestran la participación (aunque menos relevante) del canal Tok1 en esta respuesta temprana. Entonces, Hog1 podría comportarse como un regulador clave tanto para la respuesta pretranscripcional como para la transcripcional, relevantes para la adaptación al estrés debida al catión Na<sup>+</sup>.

Además, en respuesta al choque osmótico mediado por sorbitol, la fosforilación de Nha1 por Hog1 resulta en una inhibición transitoria de la actividad de extrusión del potasio en *S. cerevisiae*. Esta disminución en la pérdida de potasio vía Nha1 ayuda a las células a contender con el estrés osmótico, y en caso de un estrés por NaCl, entran menos cationes sodio a las células si se libera menos potasio, resultando entonces, en la detección de un fenotipo de incremento en la tolerancia al sodio (Kinclova-Zimmermannova & Sychrova, 2006).

La falta de Hog1 disminuye de manera importante la respuesta transcripcional de *ENA1* al estrés salino. La regulación de *ENA1* por Hog1 se lleva a cabo a través de un blanco de la cinasa río abajo, el factor de transcripción tipo bZip (*basic leucine Zipper*) Sko1, que actúa como un represor, reclutando al complejo co-represor general Ssn6-Tup1 hacia un sitio CRE (elemento de respuesta a AMP cíclico) ubicado en el promotor de *ENA1* (Proft & Serrano, 1999). El complejo represor Sko1-Ssn6-Tup1 se rompe cuando Hog1 fosforila diversos residuos en la región N-terminal de Sko1.

Además del mecanismo mediado por Sko1, Hog1 activada es capaz de reclutar al complejo de desacetilasa de histonas Rpd3-Sin3 al promotor de *ENA1*, dando lugar a la desacetilación de histonas y con ello, facilitando la entrada de la RNA polimerasa II y por lo tanto la inducción de la expresión del gen bajo estrés salino (de Nadal et al., 2004).

En contraste con el importante papel de Hog1 en la señalización de la respuesta a concentraciones tóxicas de NaCl, la exposición de células de levadura a concentraciones relativamente bajas de LiCl (50 a 100 mM) ocasiona un defecto en el crecimiento que no se agrava por la delección de *HOG1* y dispara un incremento importante en la expresión de *ENA1* que disminuye solo levemente por la delección de *HOG1* (Ruiz, González, García-Salcedo, Ramos, & Ariño, 2006). Interesantemente, en *S. cerevisiae*, hay algunos reportes evidenciando que la respuesta transcripcional de *ENA1* al pH alcalino, no involucra la activación de la

cinasa Hog1 (Ariño et al., 2010; Raquel Serrano, Ruiz, Bernal, Chambers, & Ariño, 2002).

### 1.3.3 Estrés oxidante

Ni el oxígeno ni la luz son necesarios para la vida. Se sabe de la existencia de organismos que son capaces de vivir en medios completamente anaeróbicos. Más aún, se puede hipotetizar que la vida se inició en las oscuras pozas oceánicas y que entonces, el inicio de la vida no requirió de luz. Sin embargo, por razones energéticas, ocurrió un cambio a la captura de luz y este desarrollo de sistemas de absorción de luz que ocurrió hace más de 2 mil millones de años, dio lugar a las especies fotosintéticas que producían oxígeno, y con ello, a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por las siglas en inglés: *Reactive Oxygen Species*), tales como el radical hidroxilo ( $\text{HO}^\cdot$ ) o el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) (que tienen uno o más electrones desapareados, haciéndolos muy reactivos), o el peróxido de hidrógeno  $\text{H}_2\text{O}_2$ , entre otros. Debido a su alta reactividad, las ROS fueron muy dañinas para la vida primitiva, y era de esperarse que en la evolución, se desarrollaran sistemas destoxicantes. Esto puede sugerir que las enzimas protectoras (por ejemplo, superóxido dismutasas y catalasas) son ancestrales. Desde el inicio de una atmósfera rica en oxígeno en la tierra, la vida tuvo que lidiar con el riesgo tóxico y los beneficios energéticos de esta peculiar molécula.

En los organismos aerobios, se estima que el principal productor de ROS, en forma de superóxido, es la cadena respiratoria mitocondrial. De hecho, los complejos respiratorios I y III, están involucrados en la producción de superóxido, siendo que el 70- 80% de su formación, está relacionada con la operación del ciclo Q en el complejo III mitocondrial, y la producción debida al complejo I, en presencia de NADH, está más relacionada con los acarreadores de electrones de tipo flavina o centros Fe/S. Existe además producción de ROS a nivel de la lanzadera de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) mitocondrial (enzima ligada al FAD, que dona electrones a la cadena respiratoria por medio de la poza de ubiquinonas); donde la producción de ROS parece estar relacionada con la ausencia de un sitio de unión a la coenzima Q en la GPDH mitocondrial que pudiera disminuir la producción de semiquinona durante la oxidación del glicerol-3-fosfato. Sin embargo, esto depende del tipo de célula y el estado respiratorio en que se encuentra (Rigoulet, Yoboue, & Devin, 2011).

Las ROS se pueden formar también como producto de la  $\beta$ - oxidación de los ácidos grasos en el peroxisoma, por exposición a radiación UV o energía



radical hidroxilo (OH<sup>·</sup>) a través de la reacción de Fenton/Haber-Weiss. El estrés salino induce estrés osmótico, iónico (Na<sup>+</sup>) y oxidante que dispara el desbalance en la homeostasis redox celular, y consecuentemente las ROS se acumulan en la célula. Los niveles de ROS pueden fluctuar moderadamente, regulando funciones celulares (flechas verdes), mientras que altos niveles de ROS pueden dar lugar a daño celular (flechas rojas), generando la condición llamada estrés oxidante. Tomado de González et al., 2020.

El estrés oxidante, se presenta entonces cuando existe un desbalance en los sistemas de generación de ROS y los sistemas de detoxificación.

Hay reportes de una protección cruzada ante diferentes tipos de estrés. Tal es el caso de la respuesta que se presenta de manera más eficiente ante un estrés oxidante, cuando la célula ha sido previamente expuesta a un estrés de tipo osmótico; por ejemplo, en *S. cerevisiae*, sometida a un choque hiperosmótico, se inducen los genes para responder a estrés oxidante, como el de la catalasa *CTT1*, y se elevan los niveles de glutatión (GSH), CAT y SOD, evidenciando la importancia de la respuesta antioxidante en la osmoadaptación (Lu, Wang, Bai, & Du, 2005). El fenómeno de protección cruzada permite desarrollar cierto grado de tolerancia a algún agente estresante, siempre y cuando se haya expuesto la célula a otros tipos de estrés. Esto implica que existe un mecanismo de integración de señales y respuestas entre las diferentes formas de estrés que llegan a desencadenar respuestas celulares comunes (Igal & Estruch, 2000).

En el caso de *D. hansenii*, hay trabajos recientes que también relacionan al estrés hiperosmótico con la respuesta al estrés oxidante. Por un lado, se ha demostrado que, como en *S. cerevisiae*, la exposición a NaCl y KCl induce la transcripción de genes relacionados con respuestas al estrés oxidante; y viceversa, la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, induce genes de respuesta osmótica. Al contrario de lo que sucede en *S. cerevisiae*, *HOG1* y *MSN2* se modulan por estrés a nivel transcripcional. A nivel enzimático, el estrés salino también induce defensas antioxidantes como la catalasa y la glutatión reductasa (Ramos-Moreno, Ramos, & Michán, 2019). Estos autores también reportaron que ambos tipos de estrés están conectados por la generación de ROS intracelulares y que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede afectar la acumulación intracelular de sodio.

Por otro lado, la expresión heteróloga de los genes de las catalasas A y T de *D. hansenii*, *DhCTA1* y *DhCTT1*, respectivamente, en una cepa acatalasémica de *S. cerevisiae*, complementa eficientemente la función en esta última levadura y particularmente, la cepa en la que se expresó *DhCTT1* mejoró su crecimiento en presencia de estrés salino, evento que coincide con la elevación de la actividad de catalasa, que previene la acumulación de ROS y le confiere a la levadura resistencia al estrés oxidante (González et al., 2020).

### 1.3.4 Estrés de retículo endoplásmico

La síntesis de proteínas transmembranales y de aquellas que son secretadas a los diferentes organelos celulares se realiza en los ribosomas que están asociados a la membrana del retículo endoplásmico (RE). En el lumen del RE, las proteínas se modifican ya sea por medio de N-glicosilaciones o formación de enlaces disulfuro y se lleva a cabo su correcto plegamiento para dar lugar a la forma nativa de la proteína que será transportada a su ubicación final a través de la vía secretora. Cuando los organismos se exponen a condiciones adversas que disminuyen la capacidad del RE de cumplir con estos procesos, se producen y acumulan proteínas mal plegadas, lo que lleva a una condición que se conoce como estrés de retículo endoplásmico. El estrés de RE dispara una respuesta celular que incluye la llamada “respuesta a proteínas mal plegadas”, UPR por sus siglas en inglés: *unfolded protein response*, que es una vía de señalización muy conservada entre los eucariontes, incluyendo a las levaduras (Hernández-Elvira et al., 2019). Esta vía se encarga de aliviar el exceso de proteínas mal plegadas por medio de un sensor en la membrana del RE (Ire1) que, al fosforilarse, presenta una actividad de endonucleasa citoplásmica que procesa el pre-mRNA de *HAC1*. Este mRNA es entonces traducido eficientemente en el factor de transcripción Hac1 que regula la transcripción de varios genes entre los que se incluyen chaperonas, enzimas de glicosilación y proteasas entre otros, liberando así, la acumulación de proteínas mal plegadas.

Se ha propuesto que se requieren de otras vías de señalización además de la UPR para contender con el estrés de RE, y en particular, de la vía HOG, cuya participación se ha descrito en el estrés de RE inducido con tunicamicina (Tn). La tunicamicina es un antibiótico con estructura de nucleósido, similar a la UDP-N-acetilglucosamina que bloquea el primer paso de la N-glicosilación de las proteínas.

Para responder al estrés de RE inducido con Tn, la célula requiere de la presencia tanto de Pbs2 como de Hog1. También se ha visto que Ssk1, el regulador de respuesta del sistema de fosforrelevo de la rama SLN1 de la vía HOG, es indispensable para que se lleve a cabo una respuesta al estrés por Tn; sin embargo, algunos de los componentes de la rama SHO1 son dispensables (Torres-Quiroz, García-Marqués, Coria, Randez-Gil, & Prieto, 2010). Se requiere necesariamente de la presencia de Hog1, sin embargo, no es necesario que esté fosforilada para que la respuesta al estrés de RE sea eficiente; esto fue demostrado utilizando una cepa con una proteína Hog1 no fosforilable, siendo capaz de crecer en presencia de Tn (Torres-Quiroz et al., 2010). El tratamiento con Tn, produce sólo una muy débil señal de fosforilación de Hog1 y ello no induce

su translocación al núcleo, sin embargo, sí es necesaria su actividad de cinasa. Es muy importante también la producción de glicerol para proveer de protección durante el estrés de RE, ya que al ser un osmolito, es también una chaperona química que incrementa la estabilidad termodinámica de las proteínas plegadas, sin afectar otros procesos celulares.

La búsqueda de genes cuyos productos suprimieron la sensibilidad a Tn en una cepa carente de Hog1 (pero no su sensibilidad a estrés hiperosmótico), dio como resultado la conclusión de que Hog1 podría estar realizando funciones pleiotrópicas para regular la respuesta celular a los inductores del estrés de RE ya que encontraron genes con productos de función variada que incluyen glicosilación, transporte vesicular, exocitosis, organización y biogénesis de pared celular, entre otros, lo que abre un campo de investigación por demás interesante para conocer otras funciones de Hog1 (Hernández-Elvira et al., 2019).

### 1.3.5 Adaptación al pH elevado

Algunos microorganismos exhiben un rango amplio de pH óptimo para su crecimiento, dependiendo de las condiciones de cultivo, particularmente los nutrientes, temperatura y la presencia de metales en el medio. Los alcalófilos obligados necesitan un pH comprendido entre 8.5 y 11 para desarrollarse y no crecen o crecen muy poco en pHs cercanos a la neutralidad; mientras que los alcalófilos facultativos pueden cultivarse dentro de límites de pH inferiores a los indicados. A los microorganismos que aparte de ver favorecido su crecimiento a pHs elevados, pueden tolerar al mismo tiempo altas concentraciones de sal, se les llama haloalcalófilos y en su mayoría pertenecen a las arqueas.

En general, el margen de pH para el crecimiento de las levaduras es entre 3.0 y 7.6, con un pH óptimo de 5 a 6. Algunas levaduras como *Rhodotorula glutinis* son capaces de crecer a un pH cercano a 9; sin embargo, no hay muchos estudios bioquímicos ni fisiológicos de tolerancia al pH en levaduras, predominando los realizados en bacterias (Kurita & Yamazaki, 2002).

La mayoría de los estudios relacionados con la respuesta al estrés alcalino en levaduras se han realizado en *S. cerevisiae*. El mantenimiento de un ambiente ácido se basa primeramente en la extrusión activa de protones que está mediada por la H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plasmática codificada por el gen *PMA1*. El gradiente de potencial electroquímico de protones generado es crítico para la entrada de diferentes nutrientes, incluyendo diversos cationes.

La secreción de ácido fue explicada inicialmente por la teoría redox, aunque en esos años ya se conocía que no existían acarreadores respiratorios en la membrana plasmática de la levadura; la teoría más plausible fue propuesta por A. Peña et al., 1972, en la cual el bombeo de protones se podía atribuir a una H<sup>+</sup>-ATPasa. Experimentos posteriores confirmaron esta propuesta (Peña, 1975).

Las células tienen diferentes proteínas de transporte, y como lo hemos descrito, también sucede en *D. hansenii*. Estas son responsables de controlar la composición de iones y solutos tanto del citoplasma como de los organelos. El pH citoplasmático es un parámetro celular particularmente importante, que es crucial en procesos como el control del crecimiento y el metabolismo; en este caso, el pH se encuentra regulado por transportadores tales como los intercambiadores catión/H<sup>+</sup>, mientras que el pH en los compartimentos intracelulares se encuentra regulado por una familia de bombas de protones dependientes de ATP, como la (H<sup>+</sup>)-ATPasa de la vacuola.

Una alcalinización del ambiente extracelular representa una condición de estrés para *S. cerevisiae* (y para otras levaduras también). Para sobrevivir, debe detectar el cambio y reaccionar ante él iniciando una respuesta adaptativa. La respuesta de esta levadura a la alcalinización del ambiente se ha caracterizado con cierto detalle en los últimos años, en muchos casos a través del estudio de mutantes sensibles a condiciones de pH alto y/o la definición de los ajustes transcripcionales después de la exposición a pHs alcalinos (Raquel Serrano, Martín, Casamayor, & Ariño, 2006).

La respuesta al estrés alcalino está definida como cualquier proceso que resulte en un cambio en el estado o actividad de la célula (en términos de movimiento, secreción, producción de enzimas, expresión génica, etc.) que sea el resultado de un estímulo de pH > 7.

Se han realizado algunos estudios sobre este efecto, fundamentalmente sobre los cambios de expresión de algunos genes. Se ha visto un aumento de expresión al aumentar el pH del medio en genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos (*ALD4*, *DLD3*, *SDH4*), en el transporte de fosfatos (*PHO12*, *PHO84*, *PHO89*, etc.), en el transporte de iones y homeostasis (*ENA1*, *CST13*, *FIT12*, *ARN2*, *ARN3*, etc.) e involucrados en la respuesta al estrés (*HSP30*, *PAI1*, *CCP1*, etc.) y principalmente los genes involucrados en el ciclo celular, como *RIM101*, que es un regulador positivo de la meiosis, entre otros (Serra-Cardona, Canadell, & Ariño, 2015).



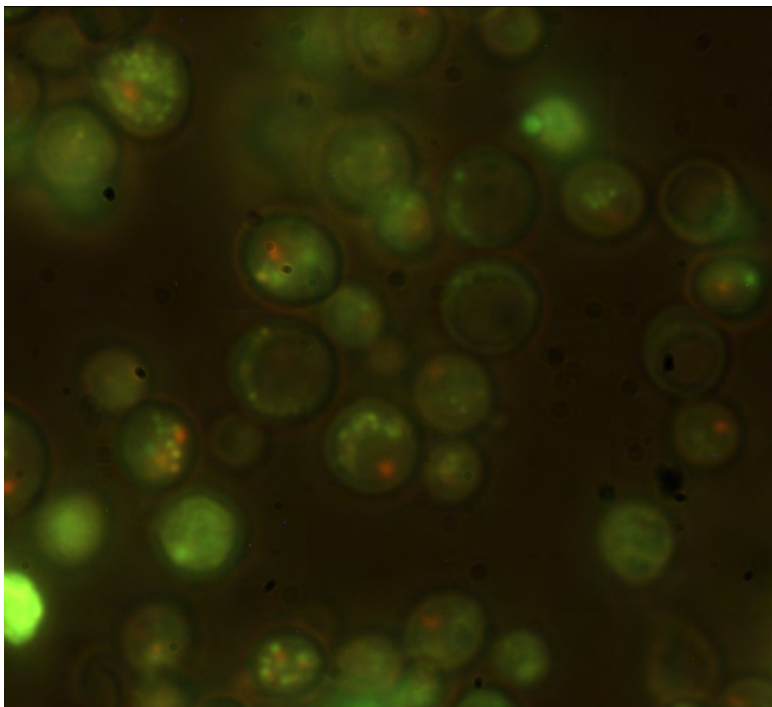
De modo interesante, la respuesta en *S. cerevisiae* es más compleja que en otros hongos, por ejemplo *Aspergillus nidulans*. En este microorganismo, el factor de transcripción PacC de dedos de zinc juega un papel primordial mediando la regulación del pH, activando directamente promotores de respuesta al pH. En *S. cerevisiae* está el gen que codifica para un homólogo de PacC, *RIM101*, que tiene un papel importante en la respuesta o adaptación a pH alcalino, reprimiendo la expresión de represores transcripcionales como *NRG1* (que regula negativamente una variedad de procesos, incluyendo el crecimiento filamentoso y la respuesta a pH alcalino). Además de la vía de *RIM101*, la adaptación a pH externo alto involucra la activación por calcio de la fosfatasa calcineurina (Raquel Serrano et al., 2006). *RIM21* es el sensor membranal del pH (a su vez parte de la vía Rim 101); *RIM8* está involucrado en la activación proteolítica de *RIM101*. *RIM101* participa también en la respuesta a estrés salino.

El grupo de Ariño ha descrito además que el estrés alcalino activa rápida y transitoriamente a *Slf2*, y que esta activación está mediada por *Wsc1* (un canal sensor membranal putativo de estrés) y que esto resulta en el incremento de la expresión de algunos genes específicos, varios de los cuales son relevantes para la adaptación al estrés alcalino (Raquel Serrano et al., 2006). Más recientemente, se describió la participación de la vía PKA en la adaptación al estrés alcalino en *S. cerevisiae* (Casado, González, Platara, Ruiz, & Ariño, 2011). El mismo grupo, después de hacer un análisis de la sobreexpresión de genes provenientes de *D. hansenii* que le confirieran la capacidad de tolerar pHs elevados a *S. cerevisiae*, encontraron al gen *DhGZF3*, identificándolo como un factor negativo putativo tipo GATA, relacionado con *ScDal80* y *ScGzf3*; sin embargo, las células que sobreexpresaron *DhGZF3*, curiosamente resultaron menos tolerantes a los cationes litio y sodio ya que no indujeron correctamente la expresión de la ATPasa de expulsión *ENA1* (García-Salcedo et al., 2006).

La combinación de estrés salino y alcalino en el comportamiento fisiológico de *D. hansenii* indujo deficiencias en sus funciones de adquisición de energía, sin embargo, es capaz de tolerar ambos estreses, considerándola entonces, como una levadura álcali-halotolerante (Sánchez, Calahorra, Ramírez, & Peña, 2018).

Es importante señalar que *S. cerevisiae* (la levadura convencional para los distintos campos de investigación) no es capaz de lidiar con un estrés salino y alcalino como el que se ha sometido a *D. hansenii*; es por ello que resulta interesante entender los procesos bioquímicos, las vías de señalización y el resultado molecular que le permiten a esta levadura poder ser álcali-halotolerante.

La adaptación a condiciones ambientales con alta salinidad es un proceso biológico de la mayor importancia en la agricultura y la biotecnología debido al incremento en la salinidad y la alcalinidad de las tierras cultivables. *Debaryomyces hansenii*, siendo una levadura naturalmente resistente a la sal y al pH elevados es un microorganismo modelo de gran importancia para la comprensión de los procesos que conllevan a esas tolerancias y en un futuro, quizá hasta de aplicación de algunas de ellas en el diseño de plantas resistentes a la sal y al pH elevado.



*D. hansenii*. tinción con FUN1 para evaluar viabilidad celular;  
microscopio de epifluorescencia, 100X.

## 2 HIPÓTESIS

## 2 HIPÓTESIS

Si la MAP cinasa HOG1 es la proteína más importante de la vía de transducción de señales de estrés hiperosmótico en levaduras, DhHog1 de *Debaryomyces hansenii* será necesaria para que esta levadura halotolerante pueda contender adecuadamente con el estrés hipersalino y, en comparación con *Saccharomyces cerevisiae*, que es halosensible, su funcionalidad será diferente.



“La planta insumisa” Remedios Varo, 1961.

Imagen tomada de <https://www.remedios-varo.com/planta-insumisa-1961/>

## 3 OBJETIVOS

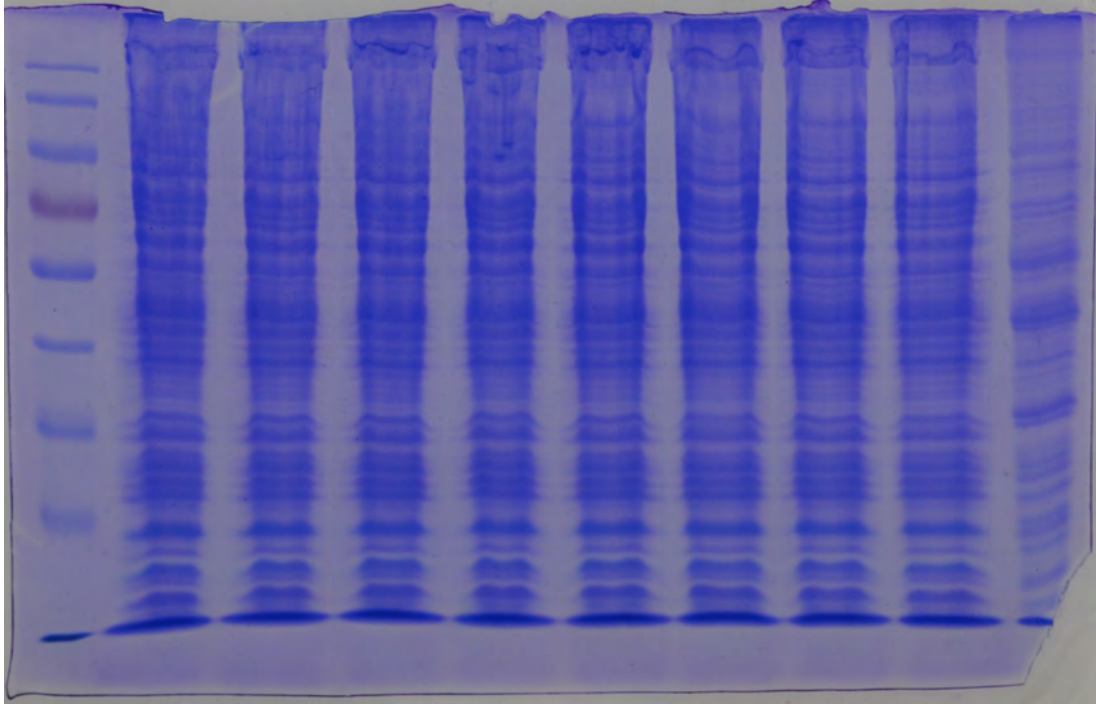
## 3 OBJETIVOS

### Objetivo General.

Analizar la funcionalidad de la MAP cinasa Hog1 de *Debaryomyces hansenii*, que es una levadura naturalmente halotolerante y compararla con la de *Saccharomyces cerevisiae*, levadura halo-sensible.

### Objetivos Particulares.

- Comparar el patrón de fosforilación de la proteína Hog1 en *Debaryomyces hansenii* y *Saccharomyces cerevisiae* en respuesta a estrés salino.
- Estudiar la localización subcelular de *DhHog1* y determinar si es translocada al núcleo en respuesta a estrés salino. Analizar la temporalidad del fenómeno.
- Estudiar la función de *DhHog1* mediante el estudio fenotípico en condiciones de estrés hiperosmótico de una mutante de *Debaryomyces hansenii*.
- Analizar el papel de *DhHog1* en la resistencia a otros tipos de estrés: de temperatura, oxidante, de retículo endoplásmico y alcalino.



Extractos proteicos de *D. hansenii* después de someterlos a una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cepas, plásmidos y medios de cultivo

*D. hansenii* Y7426 fue donada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Peoria, Illinois, USA.

La mutante *Dhhog1Δ* (*hog1Δ::SAT1-yeYFP1*) es una cepa isogénica a la cepa Y7426 y su construcción se esquematiza en la Fig. 5.4a en la sección 5 de Resultados. *S. cerevisiae* BY4742 (*MATα*, *his3-Δ1*, *leu2-Δ0*, *lys2-Δ0*, *ura3-Δ0*) y su cepa isogénica *hog1Δ* (*MATα*, *his3-Δ1*, *leu2-Δ0*, *lys2-Δ0*, *ura3-Δ0*, *hog1Δ::kanMX*) se obtuvieron de la colección de cepas mutantes *Yeast Knockout Collection*.

Las levaduras se cultivaron rutinariamente a 28°C en YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa). Para la selección de las mutantes y su mantenimiento, el YPD fue suplementado con 150 µg/mL de nourseotricina (clonNAT) (Werner BioAgents GmbH, Germany). Las modificaciones a los medios de cultivo y a las temperaturas se indican en los pies de figura de cada experimento. Se utilizó *Escherichia coli* DH5α para propagar a los plásmidos. Las bacterias se cultivaron a 37 °C en medio LB (1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.5% NaCl) conteniendo 100 µg/mL de ampicilina para la selección de los plásmidos.

Para transformar las levaduras se utilizó el vector pAYCU244 (*P<sub>DhTEF1</sub>-SAT1-T<sub>MgPGK1</sub>-P<sub>MgACT1</sub>-yeYFP-T<sub>MgTRP1</sub>*), especialmente adaptado para *D. hansenii* (Defosse et al., 2018). Se utilizó al vector pGEM-TEasy™ (Promega) para clonar y secuenciar los productos de PCR.

### 4.2 Ensayos de crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento en medio YPD al que se le adicionaron diferentes concentraciones de NaCl (indicadas en la Fig. 5.1), utilizando para ello, matraces nefelométricos de 250 mL con el objetivo de airear adecuadamente los cultivos debido a las características preferentemente respiratorias de *D.hansenii*. Los cultivos se incubaron a 28°C en un agitador orbital a 250 rpm. Se siguió el crecimiento cada hora, usando un fotocolorímetro Klett- Summerson. Las unidades Klett se convirtieron a DO<sub>540nm</sub> (Densidad óptica a 540 nm), multiplicando por 0.002. Se extrapolaron líneas rectas en la fase exponencial de la curva para cada condición y se calculó la pendiente por regresión lineal. Se calculó entonces, el



crecimiento relativo como el valor de la pendiente de cada condición experimental en relación con el valor de la pendiente en la condición sin NaCl. Esto para cada especie de levadura: *D. hansenii* y *S. cerevisiae*.

Se realizaron ensayos de crecimiento en medio sólido YPD (con 2% de agar), suplementado con las concentraciones indicadas de NaCl o sorbitol (o los agentes inductores de estrés oxidante o de retículo endoplásmico (RE)). Se utilizaron cultivos de levaduras de 16 h (*overnight*) en medio líquido YPD y con ellos se prepararon suspensiones de levaduras, ajustando la DO<sub>600</sub> a 1.0 (con YPD) a partir de las cuales, se realizaron las diluciones decimales seriadas en una placa de 96 pozos. La siembra se realizó utilizando una plancha de aluminio multi-puntas que deposita aproximadamente 5 µL de cada suspensión sobre las placas de cada medio. Las placas se incubaron a 28 °C por 48 horas y se fotografiaron. Cuando se requería, la temperatura y el tiempo se modificaron como se indica en cada figura. Cabe aclarar que únicamente se utilizó un fotocolorímetro Klett para las curvas de crecimiento en medio líquido; para todos los demás ensayos en que se requirió determinar la DO, se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU650.

### 4.3 Clonación, eliminación y etiquetamiento de *DhHOG1*

El gen *DhHOG1* se amplificó por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando los oligonucleótidos *DhHog1F* y *DhHog1R* (Tabla 4.1) y DNA genómico de *D. hansenii* como templado. El producto resultante de PCR se clonó en el vector pGEM-TEasy.

La **mutante *hog1Δ*** de *D. hansenii* se construyó por recombinación homóloga por medio de un amplicón de PCR conteniendo el casete *SAT1-yeYFP1* y extremos de recombinación homólogos a *DhHOG1* de 40 nucleótidos (Fig. 5.4a). El amplicón de PCR se sintetizó utilizando los oligonucleótidos híbridos *Dhhog1Δp244hyb\_F* y *R* (Tabla 4.1) y el plásmido pAYCU244 como templado.

**Tabla 4.1.** Oligonucleótidos utilizados en este proyecto

	(5' → 3')
<i>DhHOG1_F</i>	CTTTTCAATCGACGCTCGGC
<i>DhHOG1_R</i>	ACACTTCCAGTAGTTGTTCTGGT
<i>Dhhog1Δp244hyb_F</i>	<u>CTTTTCAATCGACGCTCGGCATTTCGGAATTAATGCCAATAAGTCTTATATATATCCGAAC</u>

<i>Dhhog1Δp244hyb_R</i>	<u>ACACTCCAGTAGTTGTTCTGGTGTAATACTTGATTGAGTTGGCTACTGAAGCCGCTAC</u>
<i>PreDhHOG1_F</i>	TGTCCCTCTTAGCCACTGGT
<i>InterDhHOG1_F</i>	TCCAGTTGGTATGGGAGCGT
<i>InterDhHOG1_R</i>	ACGCTCCCATACCAACTGGA
<i>PostDhHOG1_R</i>	ATTCTAGAAATTCGCACTG
<i>SAT1_F</i>	ATTTCCGGTGATCCCTGAGCA
<i>SAT1_R</i>	TGTGCTCCCGAGAACCAGTA
<i>YFP1_F</i>	GTCTCCGGTGAAGGTGAAGG
<i>YFP1_R</i>	ACCATGGGTAATACCAGCAGC
<i>T<sub>Mg</sub>TRP1P<sub>Dh</sub>TEF1_F</i>	GTAGCGGCTCAGTAGCCAAAGTCTTATATATATCCGAAC
<i>T<sub>Mg</sub>PGK1-3'UTRHog1_R</i>	TCCAGTAGTTGTTCTGGTGTA <u>AATACTTGATTGAGTGGAGATCACATAACCACAAGGTGCC</u>
<i>DhHOG1-YFP1_F</i>	<u>CAGCCAATACCAACAAACCAACCAAGAACAGAAAGTTGAAATGTCTAAAGGTGAAGAATT</u>
<i>T<sub>Mg</sub>TRP1-P<sub>Dh</sub>TEF1_R</i>	GTTCCGGATATATAAGACTTTGGCTACTGAAGCCGCTAC
<i>PCR4_F</i>	AAATGGCTCAAATCCAACAAGAGGGTATTCAAGCTCCTAGCAGCCAATACCAACAAACCA
<i>PCR4_R</i>	ATTCAAATTTATACATGTATTGTAATTTAAATGGAACACTTCCAGTAGTTGTTCTGGTGT
<i>PCR5_F</i>	CAAATTATAGGTGCTGGGGCAAACGGAACAACTCAAGAACAAATGGCTCAAATCCAACAA
<i>PCR5_R</i>	TTTCTAGAAATTCGCACTGTAAATGGTTACATGGATAAGAATTCAAATTTATACATGTAT
<i>DhGPD1_RT-qPCR_F</i>	AGCATTCCACAGACCTTACTTTC
<i>DhGPD1_RT-qPCR_R</i>	ATTGTCACCCCAGCCTAATC
<i>DhSTL1_RT-qPCR_F</i>	TGGGAATGGCTGACACTTATG
<i>DhSTL1_RT-qPCR_R</i>	GCTCTTCTACCCAA CTATCAATC
<i>DhACT1_RT-qPCR_F</i>	CCCAGAAGAACACCCAGTTT
<i>DhACT1_RT-qPCR_R</i>	CGGCTTGGATAGAAACGTAGAA

Los nucleótidos subrayados en los oligonucleótidos híbridos, son complementarios al locus *HOG1* de *D. hansenii*.

El **etiquetamiento** de *DhHOG1* con la secuencia de la proteína amarilla fluorescente (yeYFP) se logró también por recombinación homóloga de un

amplicón obtenido por medio de PCRs sucesivas usando al plásmido pAYCU244 como templado. A grandes rasgos: una primera reacción de PCR se diseñó para fusionar el ORF (*Open Reading Frame* / marco de lectura abierto) de *yeYFP1* en línea con el extremo 3' de *DhHOG1* y para eliminar el codón de paro al mismo tiempo. Se realizó además una reacción de PCR por separado para fusionar la región del terminador de *SAT1* con la región 3'UTR de *DhHOG1*. Estos dos productos de PCR se fusionaron en una tercera reacción de PCR con la que se obtuvo un amplicón de 2899 pares de bases (pb) conteniendo 120 pb del ORF 3' de *DhHOG1*, seguido por el gen *yeYFP1* (con el terminador de *MgTRP1*), el gen *SAT1* (flanqueado por el promotor *DhTEF1* y el terminador *MgPGK1*) y 120 pb del extremo 3'UTR (extremo no traducido en 3') de *DhHOG1*. Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones sucesivas de PCR están enlistados en la [Tabla 4.1](#). El producto final de PCR se envió a secuenciación y se utilizó para transformar a las levaduras.

## 4.4 Transformación de las levaduras

Se hizo un precultivo de *D. hansenii* en 10 mL de YPD por 24 h a 28 °C con agitación a 250 rpm. Se utilizó 1 mL de ese precultivo para inocular 50 mL de YPD y se incubó por 24 h en las mismas condiciones. Las células se cosecharon por centrifugación (4500 g, 10 min, temperatura ambiente) y se resuspendieron en 6 mL de amortiguador de fosfatos, pH 7.5 al que se le agregó (en ese momento) DTT a una concentración final de 25 mM. Esta suspensión se incubó a 30 °C por 15 min. Pasado ese tiempo, se centrifugó a 4000 g, 10 min a 4 °C y las células se lavaron 2 veces con 20 mL de agua helada y una vez con 20 mL de sorbitol 1 M, previamente enfriado en agua con hielo. Las células se resuspendieron en 3 mL de sorbitol 1 M y se mantuvieron en hielo. Se adicionó 1 µg de DNA (resuspendido en 10 µL de agua) a 200 µL de la suspensión de levaduras pre-tratadas y se transfirieron a una celda de electroporación de 0.2 cm de ancho. Las células se electroporaron con un pulso eléctrico de 2.3 kV, 25 µF y 200 Ohms en un electroporador BioRad Gene Pulser II. Se agregó inmediatamente 1 mL de YPD para lavar las células de la celda. Esta suspensión celular se utilizó para inocular 10 mL de YPD (en un matraz Erlenmeyer de 250 mL) y se incubó 24 h a 28 °C y 250 rpm para permitir la recuperación de las células. Se plaquearon 100 µL de esa nueva suspensión celular en YPD adicionado con 150 µg/mL de clonNAT y se incubaron a 28° C hasta que aparecieron colonias (24- 48 h). Las clonas transformantes se resembraron en YPD con 150 µg/mL de clonNAT y se analizaron para definir la correcta integración del DNA.

## 4.5 Ensayos de fosforilación e inmunodetección

Los western blots se realizaron como ha sido descrito (Vázquez-Ibarra et al., 2018) (ver [Anexos 9.1 y 9.2](#)). Las células cultivadas por 16 h en medio YPD se colectaron por centrifugación, se resuspendieron en medio fresco a 0.5 UDO<sub>600nm</sub> y se incubaron por 3 h a 28 °C. Se centrifugaron 15 mL de cada suspensión y las células se trataron con diferentes concentraciones de NaCl por diferentes periodos de tiempo (como se indica en cada figura). 1 mL de cada suspensión celular se fijó con 300 µL de ácido tricloroacético al 85% por 10 min a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con 1 mL de agua. Las células se lisaron con el amortiguador SB-DTT y perlas de vidrio como se ha descrito (Velázquez-Zavala et al., 2015). Se realizaron electroforesis desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para separar las proteínas de las muestras (20 µL de extracto libre de células para *D. hansenii* y 3 a 5 µL para *S. cerevisiae*) y después se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore, Edo. de México, México). La inmunodetección se realizó utilizando un anticuerpo anti-Hog1 diseñado contra Hog1 de *S. cerevisiae* (1:1000, y-215; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) para la detección de Hog1 total y un anticuerpo anti- fosfo p38 (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) para la detección de Hog1 fosforilada. El anticuerpo secundario fue un anti-cabra acoplado a HRP (peroxidasa de rábano) reconstituído a 0.1 mg/ mL en PBS- glicerol al 50% (1:10,000, Invitrogen, G21234). Para detectar la quimioluminiscencia resultante se utilizó el kit Immobilon™ *Western Chemiluminescent HRP substrate* (Millipore, MA., USA). Todos los western blots se repitieron al menos 3 veces y en las figuras se muestran los representativos.

## 4.6 Microscopía de fluorescencia

Las células que contenían el casete *SAT1-yeYFP1* integrado en el locus de *DhHOG1*, se cultivaron 16 h en medio YPD con 150 µg/ mL de clonNAT; se centrifugaron y lavaron una vez con agua y se observaron con un microscopio LSM 710-Zeiss con el software Zen black 2.3. Las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal en el modo de doble fotón. La proteína yeYFP se detectó a longitudes de onda de 514-527 nm de excitación y emisión, respectivamente.

La fusión *DhHog1-yeYFP1* se detectó en células crecidas 16 h en YPD, colectadas y resuspendidas a una DO<sub>600nm</sub> =1.0 en YPD fresco. Para detalle de la metodología, consultar el [Anexo 9.3](#). A grandes rasgos, la suspensión de levaduras se incubó por 3 h y se centrifugó para agregar a las células YPD o YPD con 2 M NaCl. Se tomaron muestras de 1 mL a los diferentes tiempos y se detuvo

la incubación con 150  $\mu$ L de formaldehído al 37% por 15 min. Las células así fijadas, se lavaron 3 veces con 1 mL de PBS. Para la tinción del núcleo se adicionó DAPI (2-(4-amidinofenil)-1H -indol-6-carboxamida) a una concentración final de 90 nM y se incubó 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron en 100  $\mu$ L de PBS. La proteína amarilla fluorescente yeYFP se observó con un microscopio de epifluorescencia NIKON con un filtro verde. Las imágenes se tomaron y procesaron utilizando el software O\_Capture Pro (versión 6.0).

## 4.7 Determinación de la producción de glicerol

Se utilizaron cultivos de 16 h en YPD para preparar suspensiones de levaduras a una  $DO_{600\text{ nm}} = 2.0$  en YPD. Para cada muestra experimental, 10 mL de la suspensión de levaduras se centrifugaron y se resuspendieron en 5 mL en YPD fresco con o sin la concentración indicada de NaCl y se incubaron por 4 h en un tambor rotatorio a 28 °C. Para la determinación del glicerol externo, se tomó 1 mL de cada suspensión de levaduras y se centrifugó a 1625 g y el sobrenadante se mantuvo en hielo. Para medir el glicerol total, 1 mL de cada suspensión se colocó en tubos de ensaye de vidrio, tapándolos con canicas y se hirvieron por 15 min, se colocaron en hielo por 10 min y luego se agitaron fuertemente en vórtex por 2 min y se centrifugaron en la microcentrífuga por 1 min a 13,000 rpm. El contenido de glicerol en las muestras así obtenidas se midió en 10  $\mu$ L de cada sobrenadante con el kit enzimático para Glicerol de Boehringer Mannheim /R-Biopharm, adaptando los volúmenes para utilizarlo en placas de 96 pozos. Se midió la absorbencia a 340 nm con un lector de microplacas POLARstar Omega. El contenido de glicerol se normalizó al peso seco de levadura en cada muestra (determinado por duplicado). El glicerol interno se calculó por medio de la resta del valor del glicerol total menos el externo en cada condición. Los datos mostrados son el promedio  $\pm$  la desviación estándar. Cada muestra fue medida en duplicado y se realizaron 3 réplicas biológicas.

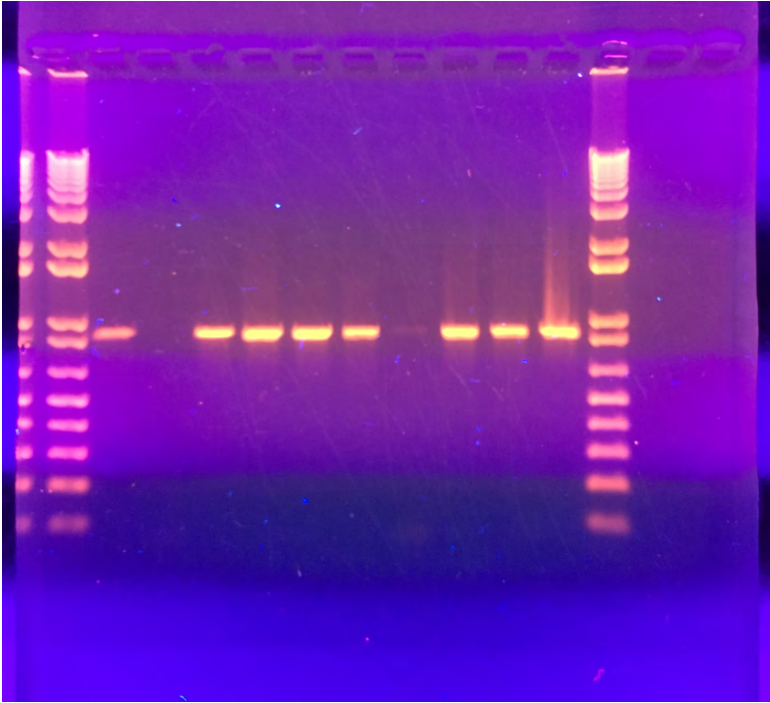
## 4.8 Extracción de RNA

Se hicieron cultivos de *D. hansenii Wild Type* (WT, o silvestre) y *Dhhog1 $\Delta$*  en YPD por 16 horas. Se ajustaron suspensiones a una  $DO_{600\text{ nm}} = 0.5$  en 100 mL de YPD y se incubaron por 3 h a 28 °C con agitación a 250 rpm. Se tomaron 50 mL de cada cultivo para centrifugarlos durante 5 min a 1750 g y se resuspendieron en 10 mL de YPD con o sin 2 M de NaCl y se incubaron bajo las mismas condiciones.

Después de la incubación, las células se centrifugaron y se resuspendieron en 1 mL de amortiguador AE (acetato de sodio 50 mM y EDTA 10 mM), para realizar la extracción de RNA con una modificación al protocolo de (Schmitt, Brown, & Trumpower, 1990), descrito “in extenso” en el [Anexo 9.4](#). La integridad del RNA se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes.

## 4.9 Análisis de la expresión génica.

El RNA total fue tratado con DNaseI (*RQ1 RNase-Free DNase™*, Promega) para remover cualquier traza de DNA genómico contaminante. Las reacciones de síntesis de cDNA (DNA complementario) se realizaron usando el kit *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega). La PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR) se realizó usando el método de la curva estándar con oligonucleótidos específicos para los genes *DhGPD1* (ID: 2903610), *DhSTL1* (ID: 2902951) y *DhACT1* (ID: 2901278), que codifican para la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa NAD<sup>+</sup>-dependiente, el simportador glicerol/H<sup>+</sup> de la membrana plasmática y actina, respectivamente. Inicialmente, se hizo un análisis en los oligonucleótidos para la corroborar la ausencia de dímeros, horquillas e hibridación cruzada. Se usaron entonces, los propuestos en la [Tabla 4.1](#), con un 100% de eficiencia en la amplificación. Se realizaron además, reacciones control sin transcriptasa reversa. El corrimiento y análisis de las RT-qPCRs se realizó en un equipo Rotor-Gene de Qiagen. Se utilizó el colorante *SYBR Green* para la detección de los productos resultantes (2X SYBR Select Mastermix de Applied Biosystems). La qPCR se llevó a cabo de la siguiente manera: 1 ciclo de 5 min a 95 °C, y 35 ciclos de —15 seg a 95 °C, 20 seg a 58 °C y 20 seg a 72 °C—. Los transcritos se normalizaron según el contenido de los transcritos de *DhACT1* obtenidos. Los niveles de expresión relativa (*fold induction*) se evaluaron con respecto al control obtenido con las células WT por el método de la curva estándar. Los datos mostrados en los resultados son el promedio ± la desviación estándar de 4 réplicas biológicas.



Amplificados de DNA por PCR en gel de agarosa

## 5 RESULTADOS

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Determinación de la halotolerancia de *D. hansenii*

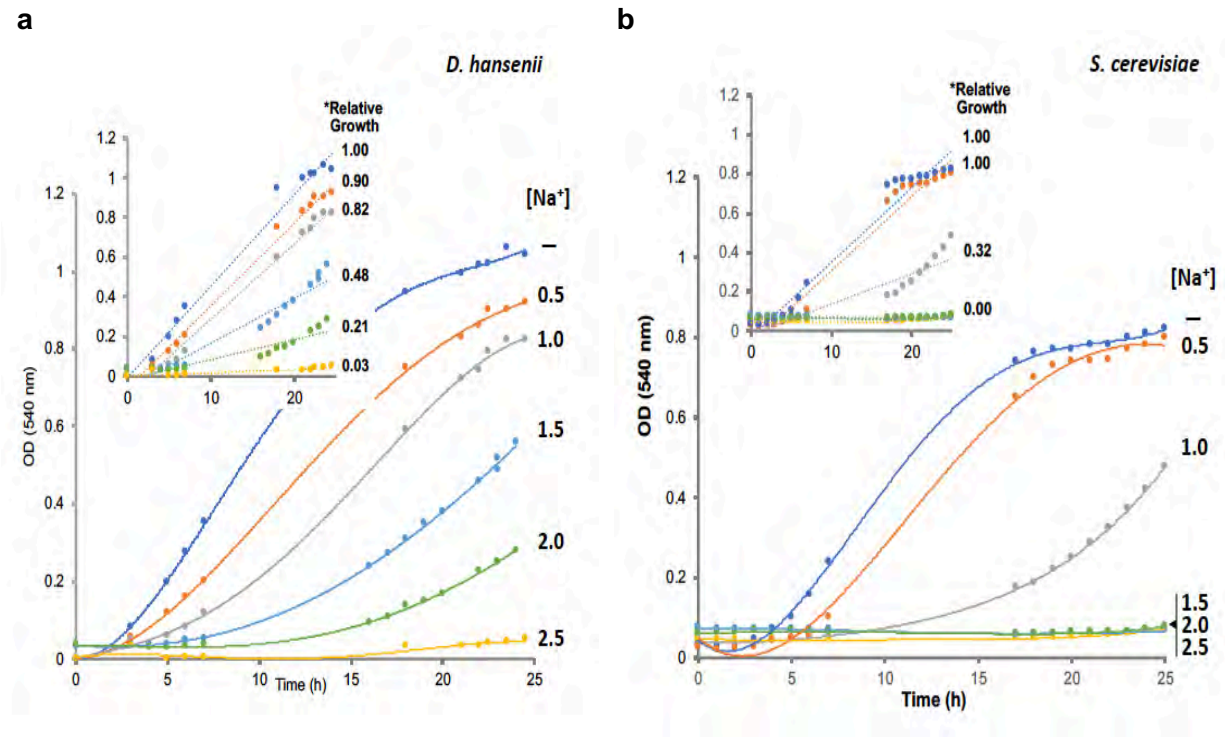
Para determinar la tolerancia máxima de *D. hansenii* al NaCl, se realizaron curvas de crecimiento en medio YPD adicionando diferentes concentraciones de sal. Para tener una idea clara de la resistencia a la sal de *D. hansenii*, este y los siguientes experimentos se realizaron comparando con una cepa silvestre de *S. cerevisiae* (halosensible). Debido a que *D. hansenii* tiene un metabolismo preferentemente respiratorio (Sánchez, et al., 2008), los parámetros de crecimiento se obtuvieron en matraces bien aireados, para garantizar una disponibilidad óptima de O<sub>2</sub>. Detectamos que a medida que aumentaba la concentración de NaCl, la velocidad de crecimiento de ambas cepas disminuía (Fig. 5.1); sin embargo, a 1 M de NaCl se encontró sólo un efecto moderado sobre el crecimiento de *D. hansenii* (Fig. 5.1a) en contraste con *S. cerevisiae*, que a tal concentración muestra un importante detrimento en su crecimiento (Fig. 5.1b). Esto se observa más claramente al comparar los valores de crecimiento relativo (obtenidos con la pendiente de la regresión lineal de la fase exponencial de crecimiento) (Fig. 5.1, insertos). El crecimiento de *S. cerevisiae* se redujo en un 70% con 1 M de NaCl, mientras que, a la misma concentración de NaCl, el crecimiento de *D. hansenii* disminuyó sólo un 20%. A concentraciones más altas de NaCl, *S. cerevisiae* no creció, mientras que *D. hansenii* todavía pudo hacerlo. Se detectó, además, una reducción del 50% en la velocidad de crecimiento de *D. hansenii* con una concentración de NaCl de 1.5 M. Aunque con 2 M de NaCl se observó un efecto significativo sobre el crecimiento de *D. hansenii*, todavía acumuló biomasa y alcanzó la fase estacionaria en el doble de tiempo que la curva control sin sal (no se muestra). Estas observaciones indican que *D. hansenii* puede crecer adecuadamente en concentraciones de NaCl que son perjudiciales para *S. cerevisiae* y que en estas condiciones de crecimiento puede tolerar hasta 2.5 M de NaCl.

### 5.2 Cinética de la fosforilación de DhHog1 como resultado de la exposición a NaCl

En *S. cerevisiae*, el estrés hiperosmótico provoca la activación de la vía HOG a través de la fosforilación transitoria de la MAPK Hog1. El tiempo en que Hog1 permanece fosforilada depende del grado del estímulo hiperosmótico, por ejemplo,

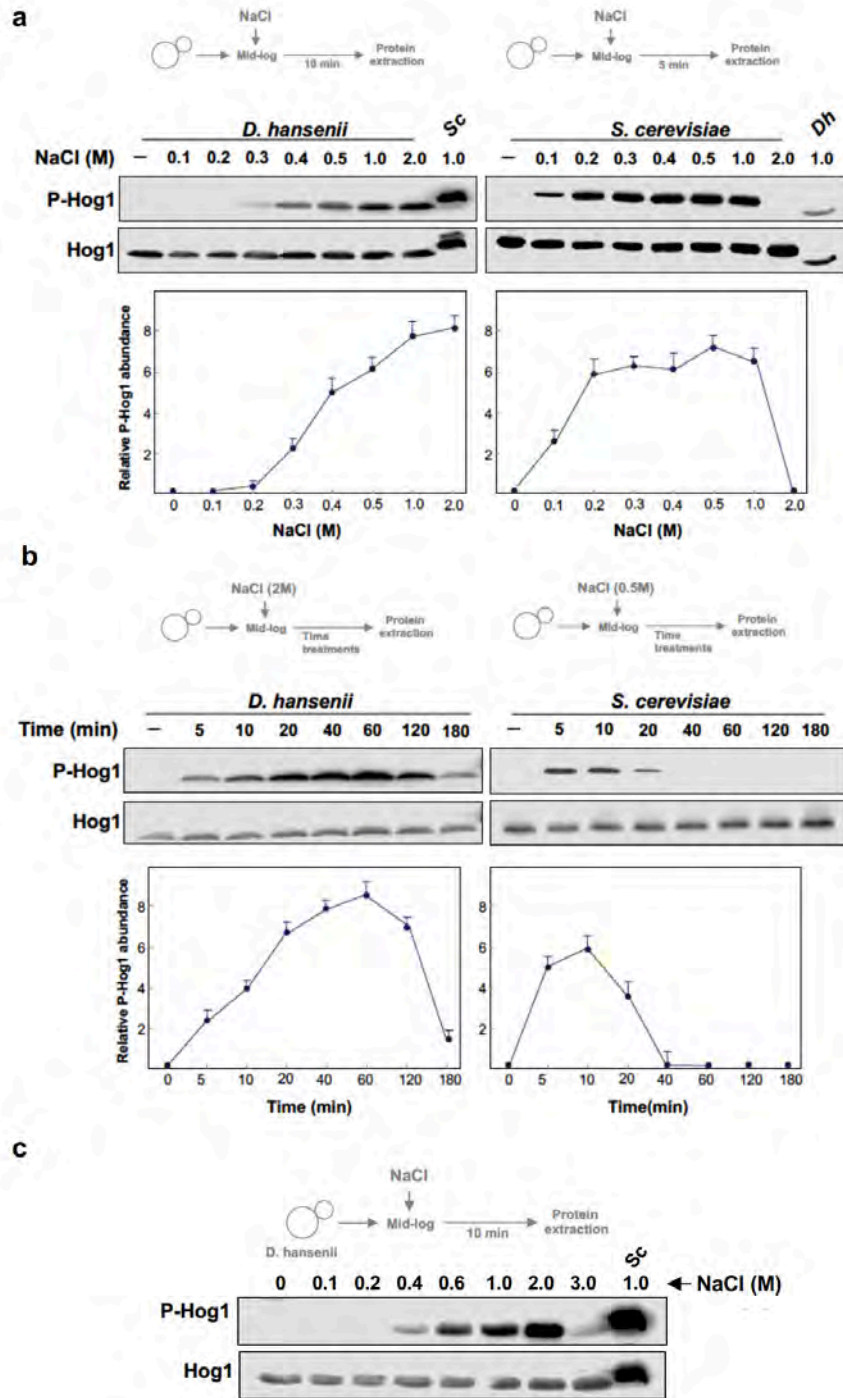


de 40 a 60 minutos bajo estrés moderado (0.4 a 0.6 M de NaCl) (Van Wuytswinkel et al., 2000; Vázquez-Ibarra et al., 2018).



**Figura 5.1** Curvas de crecimiento de *D. hansenii* (a) y *S. cerevisiae* (b) con diferentes concentraciones de NaCl. Los cultivos se realizaron en matraces nefelométricos, en medio YPD con las concentraciones indicadas de NaCl a 28°C con agitación de 250 rpm. El cultivo inicial se obtuvo de células recién cosechadas de un precultivo de 16 horas en YPD ajustado a una  $DO_{600nm} = 0.1$ . Las lecturas de crecimiento se tomaron en un fotocolorímetro Klett-Summerson. Para obtener la tasa relativa de crecimiento, se ajustaron regresiones lineales a la porción logarítmica de las curvas, normalizando con la condición control sin NaCl (insertos). Se muestran gráficas representativas de 3 diferentes réplicas biológicas.

Para analizar la contribución de Hog1 a la tolerancia a la sal de *D. hansenii*, determinamos la cinética de la fosforilación de *DhHog1* en concentraciones de NaCl a las que el crecimiento celular no se vio afectado o comprometido. Se monitoreó la fosforilación de *DhHog1* con un anticuerpo anti-fosfo-p38 que detecta la forma fosforilada de la proteína. Al exponer las células de *D. hansenii* a concentraciones crecientes de NaCl durante 10 min, la fosforilación de *DhHog1* inició con 0.3 M, y aumentó gradualmente hasta alcanzar una meseta máxima con 1 a 2 M (Fig. 5.2a). Aunque la fosforilación de *DhHog1* se redujo significativamente en concentraciones superiores a 2 M todavía se detectó a 3 M de NaCl (Fig. 5.2c).



**Figura 5.2** Fosforilación de Hog1 dependiente de la concentración de NaCl y curso temporal en *D. hansenii* y *S. cerevisiae*. Las células se cultivaron en YPD hasta la fase logarítmica media y fueron tratadas con diferentes concentraciones de NaCl. **a.** Dosis-respuesta. Células tratadas con las concentraciones de NaCl indicadas durante 10 min (*D. hansenii*) o 5 min (*S. cerevisiae*). Se incluyeron extractos de proteínas de la cepa opuesta tratada con 1M de NaCl (10 min para *Sc* y 5 min para *Dh*) como referencia. **b.** Curso temporal. Las células fueron tratadas con 2 M (*D. hansenii*)

ó 0.5 M (*S. cerevisiae*) de NaCl durante los tiempos indicados. La abundancia relativa de fosfo-Hog1 se determinó por densitometría de tres ensayos independientes. Los valores representan el cociente de fosfo- Hog1 dividido entre el total de Hog1 y multiplicado por 10. Las barras representan el error estándar. Hog1 fosforilado se detectó con un anticuerpo anti-fosfo p38 y Hog1 total se detectó en la misma membrana previamente “desnudada” con un anticuerpo anti-Hog1. **c.** Dosis-respuesta extendida a 3 M de NaCl. Se presentan imágenes representativas de cada ensayo.

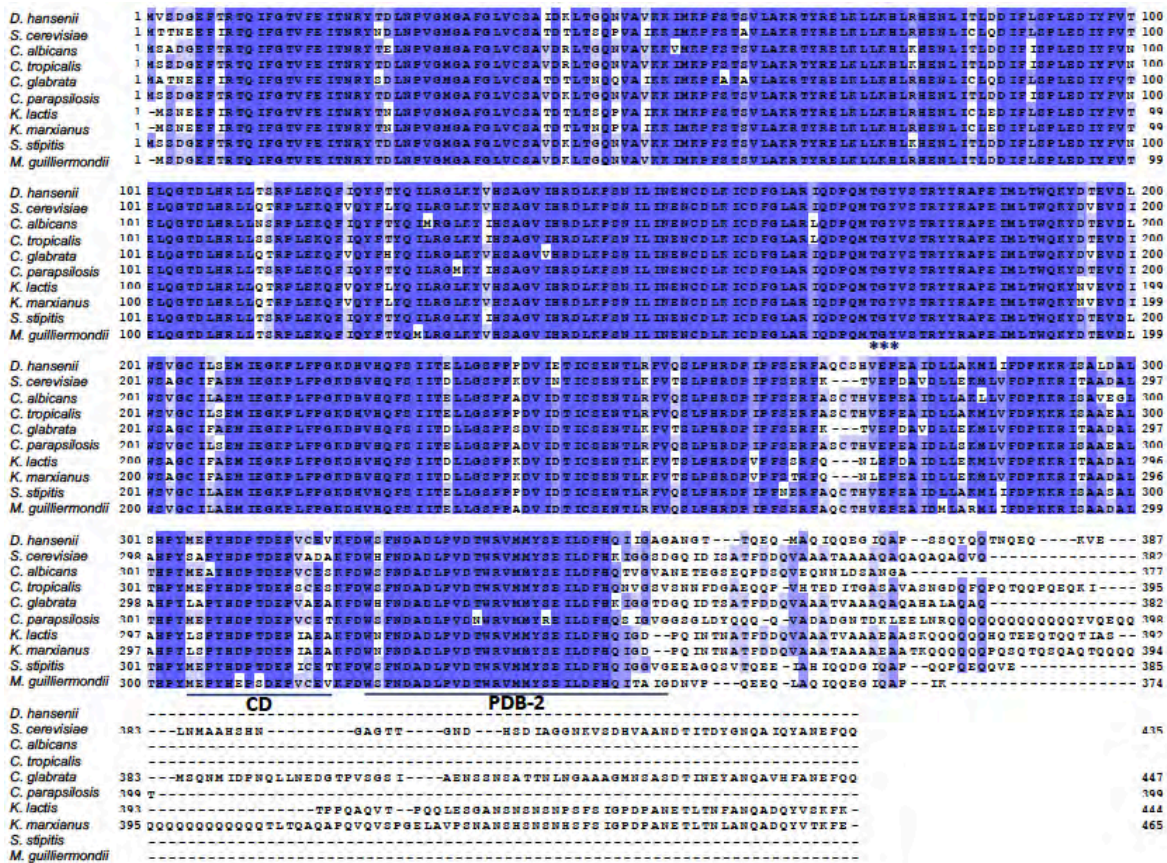
Por el contrario, ScHog1 alcanzó su máximo a 0.5 M de NaCl y luego disminuyó abruptamente hasta no detectarse a 2 M de NaCl. Posteriormente se realizó un ensayo de curso temporal, utilizando la concentración de NaCl a la cual, en el experimento anterior se veía el pico de fosforilación. En este ensayo, el nivel de *DhHog1* fosforilado aumentó con el tiempo, alcanzando su máximo a los 60 min, y luego disminuyó gradualmente (Fig. 5.2b), pero aún se detectó a los 180 minutos de exposición al NaCl. En *S. cerevisiae*, el lapso de fosforilación de ScHog1 en estas condiciones fue de menor duración que el observado en *D. hansenii*.

Comparado con ScHog1, hay un desplazamiento a la derecha de la abundancia relativa de *DhHog1* fosforilada, tanto en la respuesta dependiente de la dosis como en el curso temporal, lo que indica que *DhHog1* se fosforila a mayores concentraciones de NaCl que ScHog1 y por períodos más largos. Esta observación concuerda con el nivel de tolerancia a la sal que *D. hansenii* mostró en el ensayo de crecimiento celular y sugiere que Hog1 puede ser requerido hasta cierto punto para inducir resistencia a la alta concentración de sal.

### 5.3 Construcción de la mutante nula *DhHOG1Δ*

Las observaciones previas sugieren que la MAPK Hog1 podría desempeñar un papel importante en el mecanismo de halotolerancia en *D. hansenii*. Hay algunos antecedentes de la caracterización de esta MAPK en *D. hansenii*, entre ellos: el grupo de Mondal, en la India, clonó y secuenció el gen *DhHOG1* y mostraron que codifica para una proteína similar a la Hog1 de varias levaduras, incluyendo levaduras no-convencionales (Bansal & Mondal, 2000). El análisis de la proteína *DhHog1* predice que tiene 387 residuos de aminoácidos y comparte un 86% de identidad con ScHog1 (Fig. 5.3). En su secuencia contiene el motivo fosforilable TGY (treonina-glicina-tirosina) dentro del asa de activación y los dos dominios de unión a Pbs2: el dominio de unión “common docking” (CD) y el dominio PBD-2 (Murakami, Tatebayashi, & Saito, 2008). El extremo C-terminal de *DhHog1* muestra grandes diferencias en longitud y secuencia en comparación con el de ScHog1; sin embargo, *DhHog1* conserva la región que participa en la regulación de la autofosforilación de ScHog1 (Maayan et al., 2012). Curiosamente, el

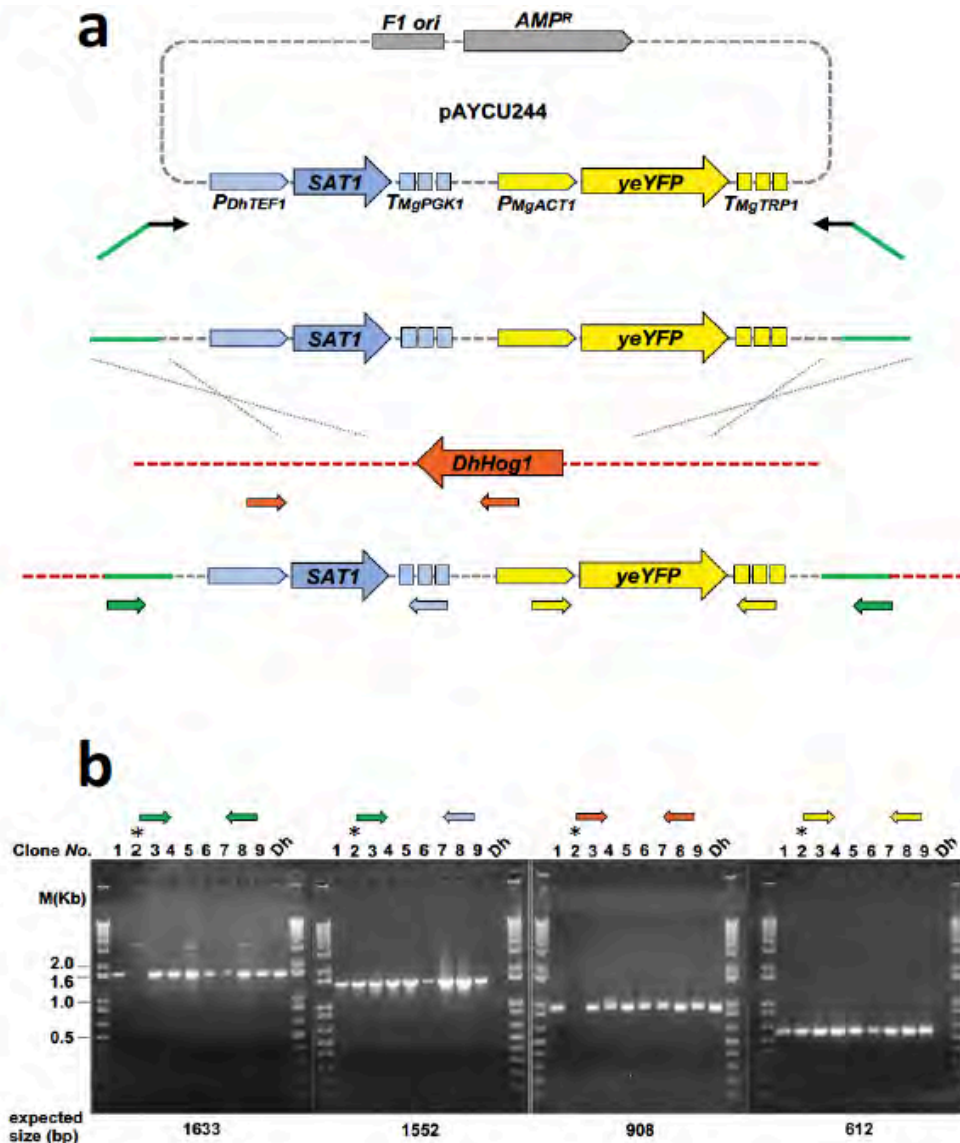
alineamiento que se muestra en la Fig. 5.3 indica que las especies relacionadas con el clado CTG muestran una reducción en la longitud de la región C-terminal. Esto podría reflejar que, como se observó anteriormente en sistemas de dos componentes en *Saccharomycotina* (Hérivaux et al., 2018), algunas rutas en la evolución fueron clado-específicas dentro de las vías de respuesta a estrés.



**Figura 5.3** Alineamiento de la secuencia Hog1p de varias levaduras no-convencionales y *S. cerevisiae*. El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó utilizando la plataforma de Clustal Omega de EMBL-EBI y se utilizó JalView para visualizar la alineación. Las levaduras que se incluyeron para comparación con *Debaryomyces hansenii* fueron: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Scheffersomyces stipitis* y *Meyerozyma guilliermondii*. El sitio de fosforilación conservado TGY se muestra con asteriscos. Se indican el dominio CD (“Common docking”) y el dominio PBD-2 (unión a Pbs2). El azul oscuro corresponde al 100% de identidad entre especies.

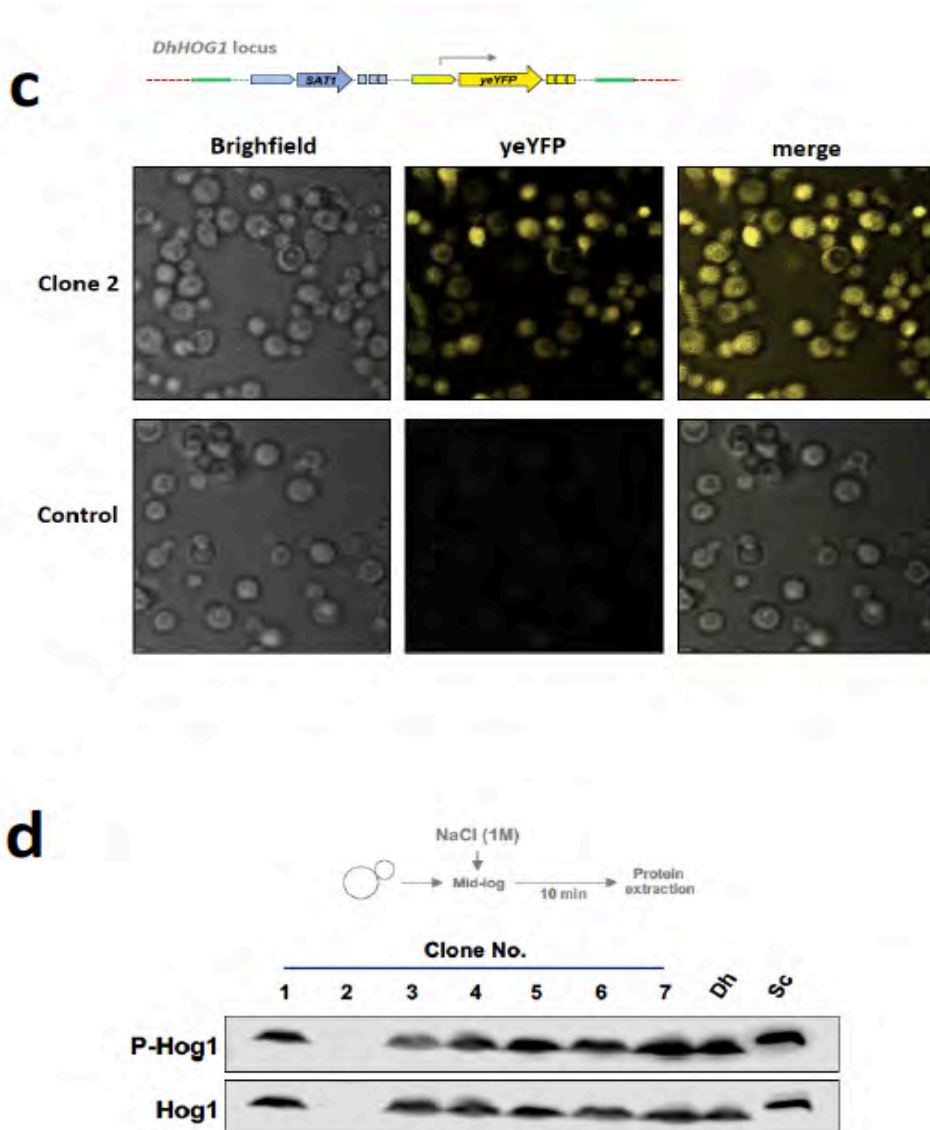
Para conocer la contribución de *DhHog1* a la halotolerancia de *D. hansenii*, diseñamos una estrategia para la construcción de una cepa carente de *HOG1*. Las herramientas convencionales para la construcción de una cepa carente de genes no son útiles en *D. hansenii*, ya que esta levadura, al pertenecer al clado CTG, traduce ambiguamente el codón CUG en Serina o Leucina (Tekai et al., 2000). En este

proyecto, utilizamos el plásmido pAYCU244 (Fig. 5.4a), que había sido previamente optimizado para el manejo genético del uso de codones en *D. hansenii* (Defosse et al., 2018). Para reemplazar el locus de *DhHOG1* por recombinación homóloga, se utilizó un casete que contiene el gen *SAT1* (que confiere resistencia a la nourseotricina) y el gen reportero *yeYFP* (*yeast-enhanced Yellow Fluorescent Protein*) (Fig. 5.4a). Se aislaron sólo 9 clonas (de 624 resistentes a nourseotricina) que fueron sensibles a 2 M de NaCl. Estas 9 clonas se sometieron a una serie de reacciones de PCR para explorar la estructura de su locus de *HOG1* (Fig. 5.4b).



**Figura 5.4 a.** Mapa del plásmido pAYCU244 y estrategia de delección de *DhHOG1*. Se muestran sólo los genes relevantes y secuencias reguladoras del pAYCU244 (Defosse et al., 2018). El gen *SAT1* confiere resistencia a nourseotricina y el gen *yeYFP* codifica para la proteína amarilla

fluorescente. Las pequeñas flechas negras indican los oligonucleótidos para generar el casete *SAT1-yeYFP* flanqueados por colas recombinantes de 40 pb (verde). La integración del casete y reemplazo del gen *DhHOG1* se indica con pequeñas líneas grises punteadas. Las flechas de colores indican los oligonucleótidos utilizados para verificar el reemplazo de los genes. **b.** Análisis de PCR de las presuntas clonas recombinantes. Se utilizó DNA genómico como templado. Las flechas de colores (mismo código que en **a**) en la parte superior de los geles indican los oligonucleótidos utilizados en cada reacción. *Dh* denota productos de PCR de la cepa silvestre (WT, *wild type*). Se indica el tamaño esperado de los productos de PCR en pares de bases (bp). El asterisco indica la clona con la integración correcta.



**Figura 5.4 c.** Imágenes de microscopía de *D. hansenii* WT (control) y de la clona No. 2. Células frescas cultivadas en YPD o YPD + nourseotricina (clona No. 2) observadas por microscopía confocal de doble fotón en un microscopio LSM 710-Zeiss. La proteína yeYFP se observó a 514-527 nm (longitudes de onda de excitación y de emisión, respectivamente); también se visualizaron

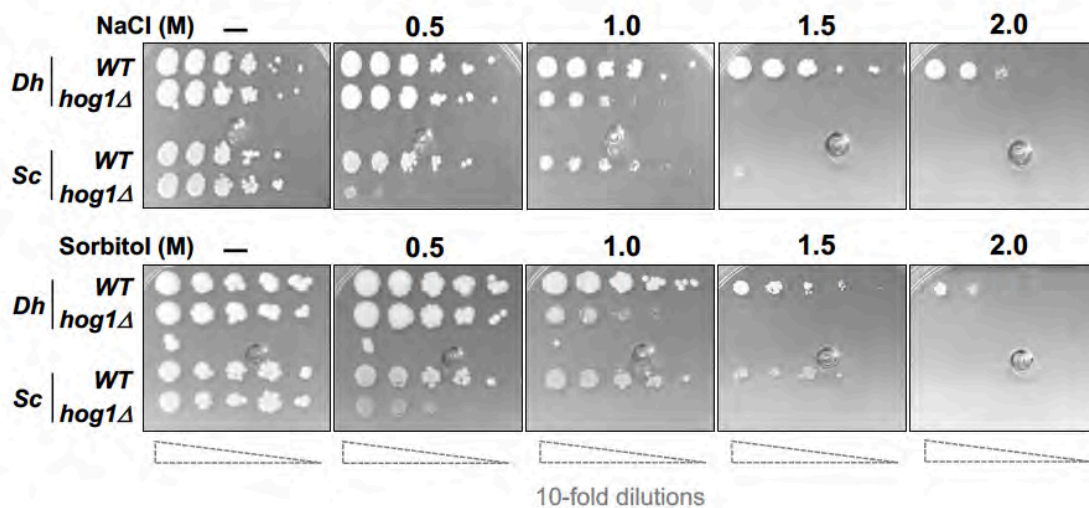
imágenes en campo claro. **d.** Detección de Hog1 y fosfo-Hog1 en clonas recombinantes por Western Blot. Células cultivadas en YPD hasta la mitad de la fase logarítmica se incubaron durante 10 min en NaCl 1 M y se prepararon extractos proteicos. Hog1 fosforilada (P-Hog1) se detectó con un anticuerpo anti-fosfo-p38 y luego se detectó Hog1 total con un anticuerpo anti-Hog1 en la misma membrana previamente desnudada. Se cargaron extractos proteicos de *D. hansenii* (*Dh*) y *S. cerevisiae* (*Sc*) de células tratadas en las mismas condiciones, en el mismo gel.

Estas 9 clonas se sometieron a una serie de reacciones de PCR para explorar la estructura de sus *loci HOG1* (Fig. 5.4b). Parecía que tres clonas habían integrado el casete *SAT1-yeYFP* en el locus adecuado (Clonas 2, 5 y 8); sin embargo, las clonas 5 y 8 presentaron también el amplicón silvestre (WT) *HOG1*. Solo en la clona 2 se encontró el casete *SAT1-yeYFP* correctamente integrado por un doble entrecruzamiento con el locus *HOG1*, lo que sugirió que se trataba de una auténtica mutante nula de *HOG1*. Esto se confirmó además con dos observaciones más: la clona 2 mostró una alta expresión del reportero *yeYFP* (Fig. 5.4c) y no mostró reacción cruzada con el anticuerpo anti-Hog1 ni con el anticuerpo anti-fosfo-p38 después del tratamiento con NaCl 1 M (Fig. 5.4d). En conjunto, estas observaciones sugieren que el entrecruzamiento doble (por recombinación homóloga) no es un evento frecuente en *D. hansenii* y que la mayoría de las integraciones ocurren ectópicamente como se observó previamente en otras especies de levaduras no convencionales (Kretzschmar et al., 2013; Oguro et al., 2017; Schorsch, Köhler, & Boles, 2009). Estos resultados podrían, además, explicar la dificultad de otros autores para obtener mutantes en esta levadura.

## 5.4 *DhHOG1* se requiere para la halotolerancia en *D. hansenii*

La participación y la contribución de Hog1 en la halotolerancia de *D. hansenii* se determinó mediante pruebas de goteo con diluciones seriadas en placas de YPD con concentraciones crecientes de NaCl. En este ensayo, la cepa silvestre de *D. hansenii* (WT) creció adecuadamente en todas las concentraciones de NaCl probadas (Fig. 5.5), lo cual concuerda con las cinéticas de crecimiento mostradas en la Fig. 1. Comparado con la mutante *Schog1Δ*, que es sensible a concentraciones moderadas de NaCl, el crecimiento de la mutante *Dhhog1Δ* en NaCl 0.5 M es indistinguible del de su cepa silvestre. Sin embargo, la inactivación de *DhHog1* produjo una reducción importante del crecimiento de la levadura en concentraciones de NaCl de 1 M o mayores. Se probó también el efecto del sorbitol, que implica un tipo de estrés osmótico diferente al del NaCl. El crecimiento de *D. hansenii* silvestre en sorbitol fue similar al presentado en NaCl; sin embargo, la mutante *Dhhog1Δ* fue muy sensible a altas concentraciones de

sorbitol. Analizando cuidadosamente las cajas de YPD con concentraciones osmo-equivalentes de NaCl y sorbitol (por ejemplo, 1.0 M de NaCl vs. 1.5 M de sorbitol, de acuerdo a Anabel Almagro et al., 2000), se observa que la presencia de *DhHog1* es también un requerimiento importante para contender con las altas concentraciones de sorbitol. Estas observaciones indican que *DhHog1* es necesaria para el crecimiento óptimo en condiciones de alta osmolaridad, lo que coincide con el pico de fosforilación de *DhHog1* observado a 2 M de NaCl, corroborando su importancia para la halotolerancia de *D. hansenii*.



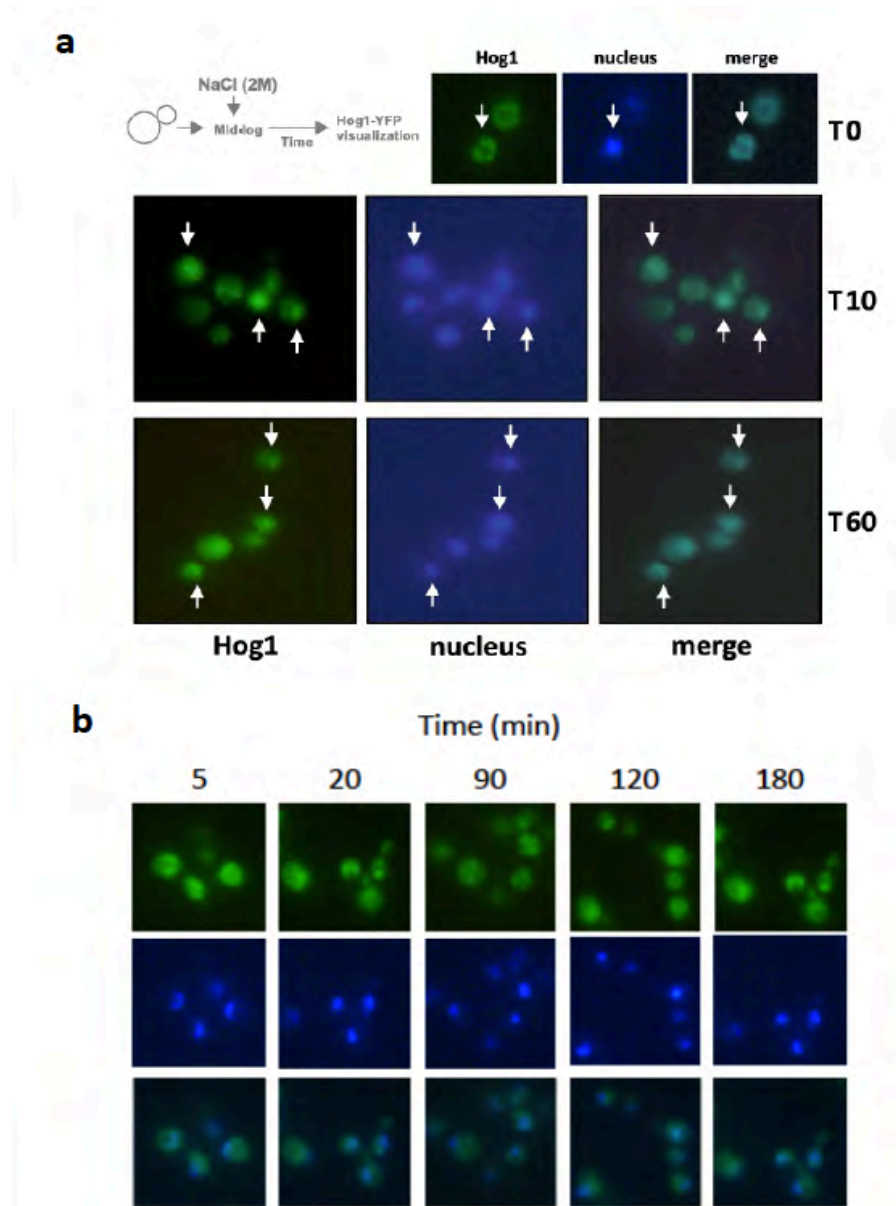
**Figura 5.5** Efecto de la dosis de NaCl y sorbitol en el crecimiento celular. Las cepas se cultivaron hasta la mitad de la fase logarítmica y se ajustó la densidad óptica de una suspensión celular a  $DO_{600} = 1.0$ . Se hicieron diluciones decimales seriadas y se colocaron gotas de aproximadamente 5  $\mu$ L en cajas con YPD o YPD más las concentraciones indicadas de NaCl o sorbitol. Las cajas se incubaron por 72 h a 28 °C y fueron fotografiadas. *Dhhog1* $\Delta$  corresponde a la clona 2 de la Fig. 5.4.

## 5.5 *DhHog1* se transloca parcialmente al núcleo después de un tratamiento hiperosmótico.

En *S. cerevisiae*, la fosforilación de Hog1 induce su translocación del citoplasma al núcleo 5 min después de la exposición a estrés hiperosmótico en células WT (Ferrigno et al., 1998). Para determinar si *DhHog1* se transloca al núcleo después de la exposición a 2 M de NaCl, se le etiquetó con la proteína yeYFP. Se diseñó una estrategia similar a la de la construcción de la mutante nula de *HOG1*, excepto que el gen *yeYFP1* se clonó en el marco de lectura abierto de *DhHOG1*, en el extremo 3' sin el codón de paro. La integración del casete *HOG1-yeYFP1-SAT1* en el locus de *DhHOG1* se realizó también por recombinación homóloga. Con esta



estrategia, se detectó que *DhHog1* se mantiene en el citoplasma en condiciones isosmóticas, pero después de diferentes tiempos de incubación bajo un choque hiperosmótico con 2 M NaCl, se detectó una fracción de la señal de yeYFP también en el núcleo (Fig. 5.6a). En algunas réplicas, se observó que *DhHog1* se distribuyó uniformemente entre el citoplasma y el núcleo desde los 5 hasta los 180 minutos después del tratamiento (Fig. 5.6b), esto a pesar de que en los resultados previos se había observado que a los 180 min la cantidad de *DhHog1* fosforilada había disminuido notablemente (Fig. 5.2b).



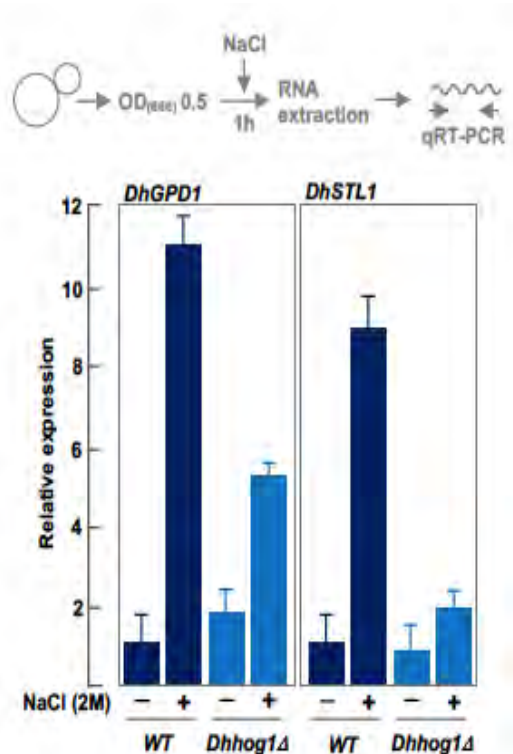
**Figura 5.6 a.** Localización de *DhHog1*-yeYFP después del tratamiento hiperosmótico. Las células que llevan el gen híbrido integrado *DhHOG1*-yeYFP se cultivaron hasta la fase logarítmica media y

se trataron o no (T0), con 2 M de NaCl durante 10 min (T10) o 60 min (T60). Imágenes representativas de células que muestran *DhHog1-yeYFP* y DAPI (núcleo). Las imágenes se obtuvieron por microscopía de epifluorescencia. **b.** Tiempo extendido del curso temporal del tratamiento hiperosmótico con 2 M de NaCl (desde 5 a 180 min).

## 5.6 *DhHog1* regula la transcripción de *DhGPD1* y de *DhSTL1* bajo estrés hiperosmótico

El estrés hiperosmótico induce cambios en la transcripción de algunos genes que se requieren para respuestas a corto y largo plazo. Para determinar si la proteína Hog1 de *D. hansenii* tenía actividad transcripcional en genes canónicamente osmo-regulados, se midió la expresión de *DhGPD1* (que codifica para la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, NAD<sup>+</sup>-dependiente) y *DhSTL1* (que codifica para el simportador glicerol-protón de la membrana plasmática) bajo un estrés hiperosmótico tanto en la cepa silvestre (WT) como en la *Dhhog1Δ*. Un choque hiperosmótico de 2 M de NaCl por 1 hora dio lugar a una fuerte inducción de la transcripción de ambos genes en la cepa silvestre, de aproximadamente 10 veces el valor de los controles en ausencia de estrés (Fig. 5.7). En la mutante *Dhhog1Δ* la expresión de *DhGPD1* y *DhSTL1* también se indujo bajo las mismas condiciones, pero los niveles de transcritos solamente alcanzaron la mitad o un cuarto de valor, respectivamente, que en la cepa silvestre. Es interesante que, mientras que la expresión de *DhSTL1* fue enteramente dependiente de *DhHog1* bajo estrés, cerca del 50% de la expresión de *DhGPD1* no dependió de *DhHog1* en el choque hiperosmótico.

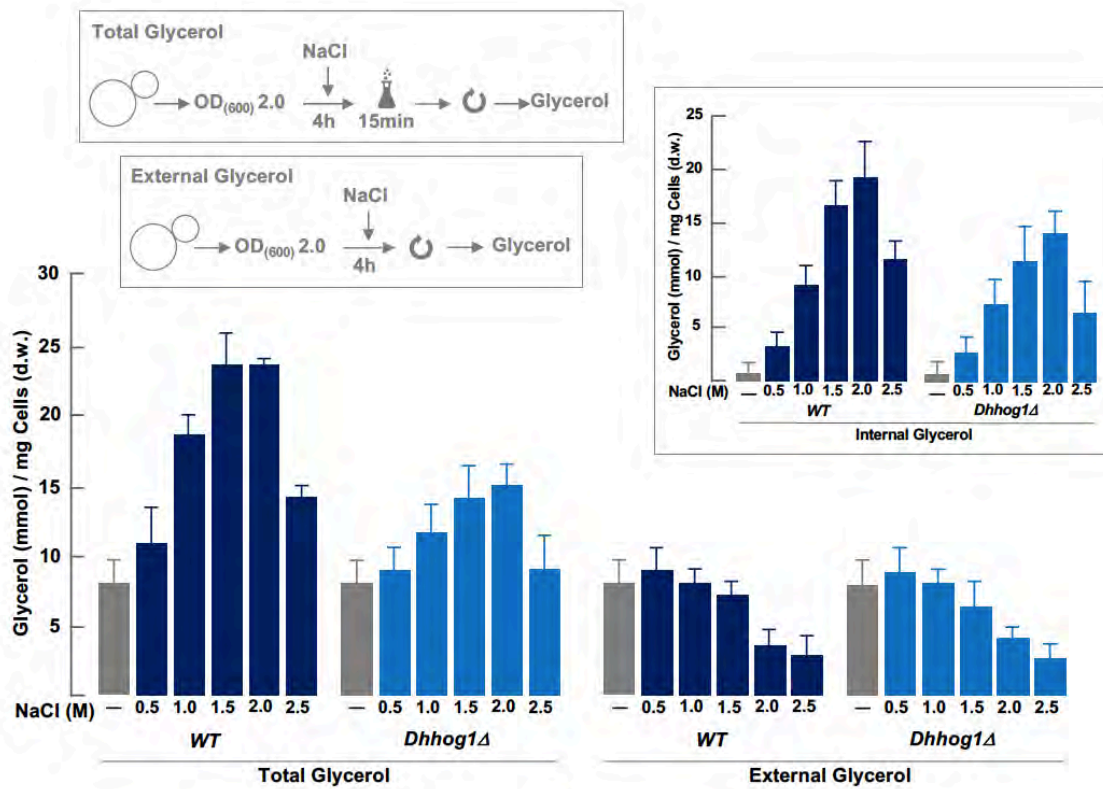
Figura 5.7 →



**Figura 5.7** Efecto del estrés hiperosmótico y la inactivación de *DhHog1* en la expresión génica. Se cultivaron células silvestres y *Dhhog1Δ* en YPD hasta una  $DO_{600} = 0.5$  y se trataron o no con 2 M de NaCl por 1 hora. Se obtuvo el RNA total y se realizó un análisis de qPCR. Los niveles relativos de los transcritos de los genes *DhGPD1* y *DhSTL1* se obtuvieron del valor promedio de 3 experimentos independientes ( $\pm$  desviación estándar) normalizados al valor del transcrito del gen *DhACT1*.

## 5.7 *DhHog1* contribuye parcialmente a la producción de glicerol bajo estrés hiperosmótico.

En *S. cerevisiae*, Hog1 regula la concentración intracelular de glicerol a través de dos mecanismos: una rápida acumulación debida a la modulación directa de la actividad de algunas de las enzimas encargadas de su síntesis en la vía metabólica y una inducción transcripcional a largo plazo de los genes que se requieren para la producción y acumulación de glicerol (Schaber, Baltanas, Bush, Klipp, & Colman-Lerner, 2012). Estudiamos la contribución de *DhHog1* a la producción y acumulación de glicerol a largo plazo, tratando de explicar la adaptación de la levadura a ambientes con altas concentraciones de sal. Las células se incubaron con concentraciones crecientes de NaCl y se midió el glicerol total y el externo. El tratamiento hiperosmótico indujo un aumento gradual de la concentración total de glicerol, el cual alcanzó un máximo con 1.5 – 2 M NaCl (Fig. 5.8). La cantidad de glicerol a esas concentraciones de NaCl fue mayor en cerca del triple, comparada con las células sin tratar. Con 2.5 M de NaCl, la cantidad de glicerol disminuyó, muy probablemente debido a defectos pleiotrópicos en la fisiología de las células y probablemente por la disminución en su viabilidad.



**Figura 5.8** Efecto del estrés hiperosmótico e inactivación de *Dhhog1* en la acumulación de glicerol. Células silvestres y la mutante *Dhhog1Δ* se cultivaron en YPD hasta una  $DO_{600} = 2.0$  y se trataron o no con las concentraciones indicadas de NaCl por 4 h. La suspensión celular se dividió en dos; una se hirvió por 15 min y se utilizó para cuantificar el glicerol total y la segunda se centrifugó y se utilizó el sobrenadante para cuantificar el glicerol externo. El glicerol interno (inserto), se calculó por medio de la resta del valor de glicerol total menos el externo. Las barras representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. Los valores fueron normalizados por el peso seco de las muestras de levadura utilizadas.

La concentración total de glicerol en la mutante *Dhhog1Δ* siguió una cinética similar a la de la cepa silvestre (WT), salvo que la máxima acumulación del osmolito a 2 M de NaCl fue sólo del doble que la condición sin estrés; este valor representa el 60% de la cantidad máxima de glicerol acumulado por la cepa WT (Fig. 5.8). El glicerol interno siguió una cinética parecida a la del glicerol total en ambas cepas, la WT y mutante *Dhhog1Δ* (Fig. 5.8, inserto). Aún cuando podría parecer que las diferencias no son significativas, hay que considerar que los valores están referidos al peso seco de las muestras. Esto es debido a que, como se reportó en 2008, el volumen interno de *D. hansenii* disminuye considerablemente conforme se incrementa la concentración de sal en el medio (Sánchez et al., 2008); como ejemplo, en ausencia de sal, *D. hansenii* tiene un volumen de 0.395 mL/g (de peso húmedo) y en 1 M de NaCl, por cada gramo de

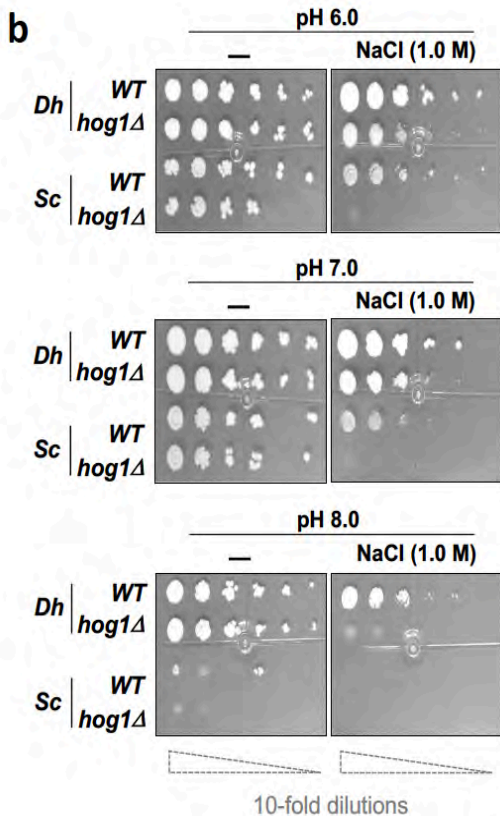
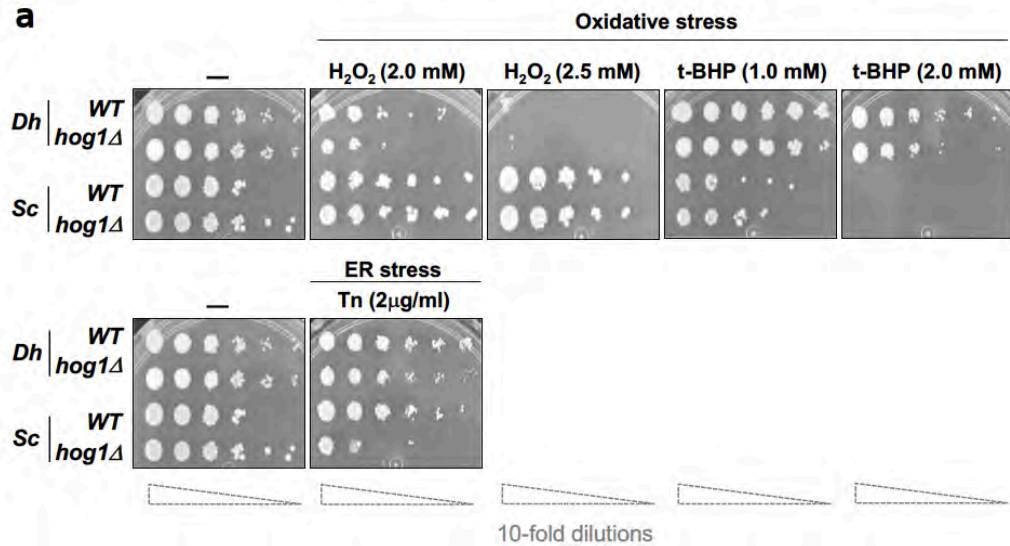
levadura (peso húmedo), corresponde un volumen interno de 0.241 mL. Con esto, consideremos pues que, si los valores obtenidos de glicerol interno se calcularan en referencia al volumen interno (no se tienen hasta ahora los datos para cada una de las concentraciones de NaCl), las diferencias serían mucho mayores. Las observaciones indican entonces que, bajo estas circunstancias, la contribución de *DhHog1* a la acumulación del glicerol total es de cerca del 40% bajo condiciones hiperosmóticas. Este resultado concuerda con las observaciones previas, a través de las cuales se detectó que la expresión de *DhGPD1* tiene un componente independiente de *DhHog1* bajo estrés hiperosmótico. En contraste con el glicerol total, la cantidad de glicerol externo en la cepa WT permaneció constante hasta 1.5 M de NaCl y luego disminuyó moderadamente a 2.0 y 2.5 M NaCl (Fig. 5.8). En la mutante *Dhhog1Δ* se detectó una cinética similar para el glicerol externo bajo las diferentes concentraciones de NaCl, indicando que *DhHog1* no contribuye a la regulación del eflujo de glicerol a través de la membrana bajo estas condiciones.

## 5.8 Participación de *DhHog1* en la respuesta a diferentes factores de estrés

A la fecha, es muy claro que la vía HOG tiene efectos pleiotrópicos en una variedad de condiciones de estrés (Hernández-Elvira et al., 2019). Tal es el caso también de la vía Sty1 de *Schizosaccharomyces pombe*, análoga a la vía HOG1 de *S. cerevisiae*. En *S. pombe*, Sty1 participa en una variedad de estreses como el osmótico, choque térmico, estrés oxidante, estrés por luz UV, ayuno de nitrógeno, entre otros (Hohmann, 2002). Para evaluar si *DhHog1* juega un papel en otras condiciones de estrés diferentes al hiperosmótico, determinamos el crecimiento celular por medio de pruebas de goteo de diluciones seriadas en placas conteniendo agentes que inducen estrés oxidante, estrés de retículo endoplásmico, estrés alcalino y también estrés térmico a temperaturas bajas y elevadas.

Bajo condiciones de estrés oxidante inducido con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o hidroperóxido de ter-butilo (t-BHP), encontramos dos observaciones generales: primero, comparada con *S. cerevisiae*, *D. hansenii* fue muy sensible a  $H_2O_2$ , pero por alguna razón resistente al estrés inducido por t-BHP (Fig. 5.9a). En segundo lugar, la mutante *Dhhog1Δ* fue moderadamente sensible al estrés oxidante inducido con  $H_2O_2$ , pero no con t-BHP, mientras que la mutante *Schog1Δ* fue resistente a ambos agentes (Fig. 5.9a). Estas observaciones sugieren que *DhHog1* podría participar en la respuesta a estrés oxidante, lo que concuerda con la fosforilación de *DhHog1* inducida con  $H_2O_2$  (Sharma et al., 2005). Bajo

condiciones de estrés de retículo endoplásmico (RE) inducido con el antibiótico tunicamicina (Tn) (Torres-Quiroz et al., 2010), se encontró que la mutante *Dhhog1Δ* fue solo moderadamente sensible a Tn, a concentraciones a las que la mutante *Schog1Δ* muestra una afectación importante a su crecimiento (Fig. 5.9a).

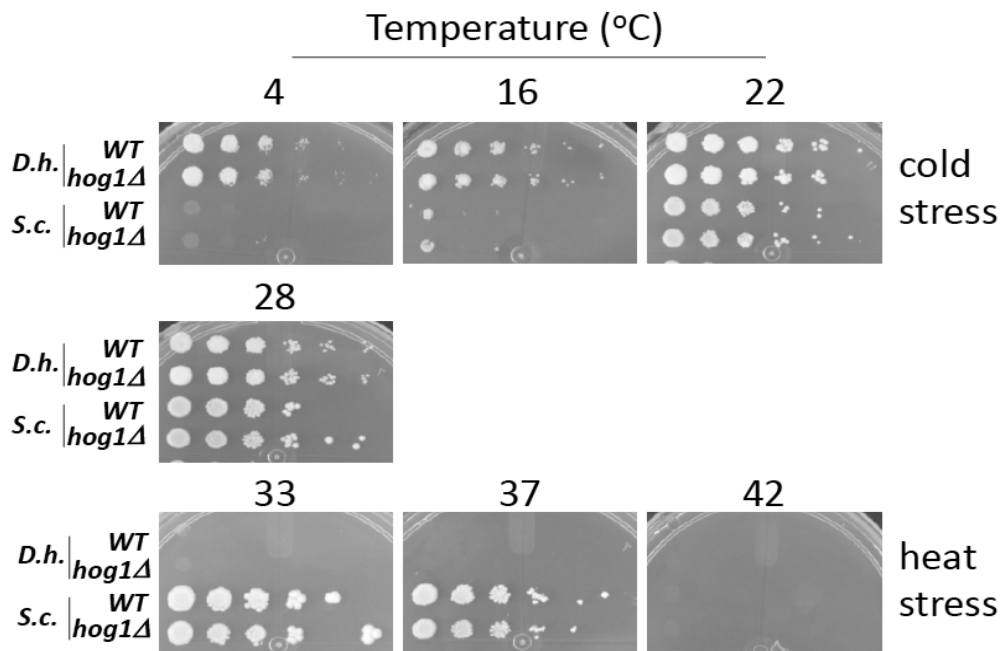


**Figura 5.9 a.** Efecto del estrés oxidante y de retículo endoplásmico sobre el crecimiento celular. Las cepas indicadas se cultivaron hasta la fase logarítmica media y se ajustaron a una  $DO_{600} = 1.0$ . Se colocaron alícuotas de diluciones seriales decimales en YPD o YPD con las concentraciones indicadas de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), hidroperóxido de t-butilo (t-BHP) o tunicamicina (Tn). Los ensayos de estrés oxidante y de retículo endoplásmico se realizaron con los mismos cultivos al mismo tiempo, por lo que la placa de control se muestra por duplicado para una mejor comparación.

**Figura 5.9 b.** Efecto del estrés alcalino e hiperosmótico en el crecimiento celular. Las cepas indicadas se cultivaron y se colocaron en placas como se indica en a. El pH del medio YPD se ajustó a los valores indicados antes de la esterilización. Se utilizaron 50 mM MES-TEA, 50 mM HEPES-TEA o 50 mM TAPS-TEA para amortiguar a pH 6.0, 7.0 y 8.0, respectivamente. En ambos casos, las placas se incubaron durante 72 a 28 °C y se fotografiaron.

Con respecto al estrés debido al pH, ya se conoce la naturaleza alcali-halotolerante de *D. hansenii*. Puede crecer razonablemente bien a pH 8.0, una condición a la cual *S. cerevisiae* es altamente sensible (Fig. 5.9b; Sánchez et al., 2018). En consecuencia, se probó la capacidad de la mutante *Dhhog1Δ* de crecer en placas amortiguadas a pH 8.0 en comparación con pH neutro y ácido (7.0 y 6.0 respectivamente). Primero, como se esperaba, se encontró que la cepa WT de *D. hansenii* creció adecuadamente en las tres condiciones, mientras que el crecimiento de *S. cerevisiae* a pH 8.0 se vio muy comprometido (Fig. 5.9b). Curiosamente, la mutante *Dhhog1Δ* mostró una alta sensibilidad al pH 8.0 al combinarlo con 1 M de NaCl, que es una condición de estrés medio para *D. hansenii* (Fig. 5.9b). El efecto del estrés hiperosmótico no se observó en la mutante *Dhhog1Δ* a pH 6.0 y 7.0, lo que indica que, bajo altas concentraciones de sal, *DhHOG1* es necesario para hacer frente al estrés alcalino en *D. hansenii*.

Finalmente, se exploró si *DhHog1* tenía participación en la respuesta al estrés térmico por frío o por calor. Aparentemente, *DhHog1* no está involucrado en estos tipos de estreses (Fig. 5.10); sin embargo, se detectó que *D. hansenii* es resistente al frío, debido a su capacidad de crecer a 16 °C a corto plazo y a 4 °C a largo plazo (lo que no se observa con *S. cerevisiae*) y que es muy sensible al estrés por calor, dada su incapacidad de crecer a 33 °C o temperaturas mayores, a las cuales *S. cerevisiae* todavía crece adecuadamente.



**Figura 5.10** Efecto de la temperatura en el crecimiento celular. Las cepas indicadas se cultivaron hasta la fase media logarítmica y se ajustaron a una  $DO_{600} = 1.0$ . Se gotearon alícuotas de

diluciones seriadas decimales en placas de YPD y se incubaron a las temperaturas indicadas durante 72 h (de 16°C a 37°C) y por 15 días (4°C y 42°C) y se fotografiaron.





## 6 DISCUSIÓN

## 6 DISCUSIÓN

*D. hansenii* es una de las levaduras más halotolerantes y osmotolerantes, que bajo algunas condiciones puede crecer incluso en concentraciones hasta de 4.0 M de NaCl (Norkrans, 1966; ŌNishi, 1963). Dada esta característica, esta levadura tiene un alto potencial biotecnológico en la industria alimentaria, lo que hace a su vez que sea de gran interés comprender los mecanismos moleculares que contribuyen a su comportamiento halotolerante. A pesar de que algunos estudios han abordado la participación de la vía HOG en la respuesta al estrés hiperosmótico (Sharma et al., 2005; Sharma & Mondal, 2005), las conclusiones que se han obtenido han sido mediante la expresión génica entre especies, es decir, por expresión heteróloga.

En este trabajo, reportamos por primera vez la caracterización fenotípica de una mutante nula de *HOG1* en *D. hansenii*, lo que nos permitió determinar inequívocamente la contribución de esta MAPK a la halotolerancia de esta levadura. También hemos dado una descripción precisa de la cinética de activación de *DhHog1*, su actividad transcripcional en genes canónicos osmo-sensibles, su participación en la producción de glicerol a largo plazo, y su participación en diferentes condiciones de estrés.

La dificultad para obtener la mutante carente de *HOG1* puede explicar por qué otros autores que habían intentado obtener algunas otras mutantes parecen haber fracasado (comunicaciones personales de otros colegas). El gran número de supuestas mutantes (624) en este estudio, que fue necesario analizar para obtener una sola, es un indicador de la escasa frecuencia de las combinaciones adecuadas para lograr la inserción apropiada y obtener la mutante deseada.

Nuestras observaciones indican que la cepa silvestre de *D. hansenii* (Y7426) puede crecer en concentraciones mayores o iguales a 2 M de NaCl, lo cual es congruente con la clasificación previa de esta especie como levadura perteneciente a la clase 3 M de estrés salino (Lages et al., 1999); y que la delección de *DhHOG1* induce sensibilidad a ese margen de concentraciones. Aunque a una tasa más lenta que la cepa WT, una mutante desprovista de *DhHog1* todavía fue capaz de crecer en 1 M de NaCl, una concentración que impone un fuerte efecto negativo sobre *S. cerevisiae*, lo que ha sido detectado en este y muchos otros trabajos (Blomberg, 1997; Rodríguez-González et al., 2017).

Nuestros datos muestran que la fosforilación de *DhHog1* depende de una fuerte osmolaridad externa, y que, en una baja osmolaridad, donde la proteína

Hog1 de *Saccharomyces cerevisiae* se fosforila a un alto nivel, *DhHog1* no es activada. Se detectó en consecuencia, una alta expresión de *DhSTL1* y *DhGPD1* a 2 M de NaCl y también una alta producción de glicerol a esa misma concentración. Estas observaciones indican que la vía HOG de *D. hansenii* está configurada para funcionar en condiciones de alta osmolaridad externa y que en condiciones osmóticas bajas o medianas, deben estar activados otros sistemas de protección. Una situación similar presenta la levadura halotolerante extrema *Hortaea werneckii*, donde sus dos parálogos redundantes Hog1A y Hog1B se activan totalmente en salinidades de 3 M o más, pero no a concentraciones moderadas de NaCl (Kejžar, Grötli, Tamás, Plemenitaš, & Lenassi, 2015). El hecho de que la vía HOG pueda activarse a altas concentraciones de NaCl, está también apoyado por la capacidad de *D. hansenii* de acumular altas concentraciones de Na<sup>+</sup> dentro de la célula. Este rasgo llevó a algunos autores a describirla como “sodio incluyente” (Norkrans & Kylin, 1969; Prista et al., 1997; Prista & Loureiro-Dias, 2007).

En *S. cerevisiae*, la fosforilación de Hog1 es necesaria para su translocación del citoplasma al núcleo, que se logra en células WT después de 5 min de exposición al estrés hiperosmótico (Ferrigno et al., 1998). Esta localización nuclear es transitoria y el retorno al citoplasma ocurre por la acción de fosfatasas de proteínas, incluyendo a la fosfatasa de tirosina Ptp2 (Mattison & Ota, 2000). En *D. hansenii*, la translocación al núcleo de *DhHog1* se detectó dentro de los 10 minutos posteriores a que se impuso el estrés hiperosmótico con 2 M de NaCl y aún se detectó dentro del núcleo después de 180 min de tratamiento. Este comportamiento es congruente con el curso temporal de fosforilación obtenido con 2 M de NaCl. Curiosamente, también se detectó a *DhHog1* en el citoplasma durante todo el transcurso del tiempo de incubación con NaCl 2 M. Estas observaciones muestran algunas diferencias con estudios anteriores en los que *DhHog1* se visualizó indirectamente mediante inmunotinción (Sharma et al., 2005); ellos reportaron que la acumulación nuclear de *DhHog1* ocurría tardíamente, hasta los 90 min después del choque hiperosmótico, y luego, la reentrada al citoplasma se llevaba a cabo 150 min después. La discrepancia con nuestras observaciones podría explicarse por diferencias en los niveles de detección entre la inmunofluorescencia indirecta y la detección de la proteína híbrida *DhHog1*-yeYFP y/o por diferencias en el origen genético de la cepa. Aunque no sabemos si *DhHog1* está activa en el citoplasma en nuestras condiciones, su prolongada retención nuclear no solo coincide con su estado de fosforilación, sino también con su papel en condiciones hiperosmóticas extremas en las que es de esperarse una actividad prolongada y sostenida. En nuestros resultados, aunque se produjo una disminución en la fosforilación en períodos largos, *DhHog1* todavía se visualizó en el núcleo. Esta observación sugiere que en *D. hansenii* puede haber un mecanismo de regulación negativa, mediada quizás por fosfatasas (Mattison &

Ota, 2000). Interesantemente, en un estudio de genómica comparada del sistema de señalización HOG se reporta la falta de la fosfatasa Ptp2 en *D. hansenii* (Krantz, Becit, & Hohmann, 2006), lo que sugiere que Ptp3 (que está presente) podría asumir ambos roles.

En cuanto a la producción de glicerol, el máximo en su acumulación que ocurrió a 2 M de NaCl correlaciona muy bien con la elevada expresión de *DhGPD1* y *DhSTL1* que se detectaron a esa misma concentración. Mientras que la expresión de *DhSTL1* fue totalmente dependiente de *DhHog1*, la de *DhGPD1* fue de aproximadamente 60% dependiente de *DhHog1*. La elevada expresión de *DhSTL1* correlaciona claramente con la alta actividad del simportador glicerol/H<sup>+</sup> que se ha detectado en *D. hansenii* (Pereira, Madeira, Prista, Loureiro-Dias, & Leandro, 2014). La expresión tanto de *DhSTL1*, como de *DhGPD1* en *D. hansenii* sugiere un patrón parecido a lo que se ha encontrado con *S. cerevisiae*. *STL1* es un gen de osmo-respuesta, cuya expresión depende completamente de Hog1 (O'Rourke & Herskowitz, 2004), mientras que *GPD1* no solo depende de Hog1 bajo estrés hiperosmótico, sino también de otros sistemas de señalización (Rep et al., 1999). Bajo estrés hiperosmótico, *GPD1* puede ser también regulado transcripcionalmente por un mecanismo de des-represión por SUMOilación, mediada por el complejo Cyc8/Tup1 (Nadel, Mackie, & Gardner, 2019); es así que varios mecanismos pueden estar actuando concertadamente para llevar a cabo un control eficiente de la expresión de *DhGPD1*. Nuestras observaciones indican que hay una expresión significativa de *DhGPD1* en la mutante *Dhhog1Δ* inducida por el osmoestrés, sugiriendo que otras vías pudieran estar participando, o que una fracción de la expresión de *DhGPD1* está controlada por un mecanismo general de respuesta al estrés en *D. hansenii*. Sería interesante determinar si el estrés causado específicamente por los iones Na<sup>+</sup> en *D. hansenii* pueden activar la vía de Ca<sup>2+</sup>-Calcineurina y hasta qué grado esto pudiera regular la respuesta al estrés hiperosmótico.

En *S. cerevisiae*, Hog1 regula la concentración de glicerol a través de dos mecanismos distintos. Uno incluye la rápida acumulación de glicerol debida al cierre del canal de glicerol *Fps1* para disminuir su expulsión (Lee et al., 2013) y también el incremento de su síntesis debido a la sobre-regulación de *GPD1* (Westfall, Patterson, Chen, & Thorner, 2008), y *PFK2* (que codifica para la 6-fosfofructo-2-cinasa) (Dihazi, Kessler, & Eschrich, 2004). El segundo, consiste en la regulación transcripcional de un gran conjunto de genes necesarios para la síntesis y acumulación de glicerol (O'Rourke & Herskowitz, 2004). Aquí encontramos que *DhHog1* contribuye a respuestas a largo plazo. De hecho, la cantidad de glicerol acumulado aumentó gradualmente con el aumento de la osmolaridad, hasta alcanzar una meseta en 1.5- 2 M de NaCl, en ambas

condiciones, para el glicerol total y el interno. Esta producción de glicerol a largo plazo fue solo parcialmente dependiente de Hog1, ya que en la mutante *Dhhog1Δ* la acumulación máxima se redujo solo 1.5 veces.

La acumulación de glicerol independiente de *DhHog1* no sólo incluye al componente transcripcional, como se discutió anteriormente, sino también al aumento de la actividad de las enzimas encargadas de la producción de glicerol directamente producida por el NaCl (Adler et al., 1985; Lars André, Hemming, & Adler, 1991). De hecho, estos mismos autores reportaron que el NaCl también incrementa la actividad específica de la Gpd1 y de la dihidroxiacetona cinasa (Dak1,2), lo que aumenta la acumulación de glicerol. Es también interesante que la Gpd1 de *D. hansenii* se activa 10 veces más en presencia de NaCl que la de *S. cerevisiae* (Adler et al., 1985; Lars André et al., 1991; Thomé, 2005). Aunque se ha descrito el papel del glicerol como un osmolito compatible adecuado en *D. hansenii* (Adler & Gustafsson, 1980; Gori et al., 2005; Lages et al., 1999), es importante considerar que otros polioles como el arabinitol y la trehalosa también pueden contribuir a la osmoprotección a través de una interacción combinada (Adler & Gustafsson, 1980; González-Hernández et al., 2005). El incremento en la acumulación interna de glicerol y en la producción total y la contribución de Hog1 en *D. hansenii* coincide con lo que ocurre en *Kluyveromyces lactis*, donde el glicerol aumenta 5 veces bajo estrés hiperosmótico y *KlHog1* contribuye con el 50% de este incremento (Rodríguez-González et al., 2017). Curiosamente, *K. lactis* es halosensible y entonces, lo único que comparte con *D. hansenii*, es que ambas tienen un metabolismo predominantemente respiratorio.

Con respecto a la cantidad de glicerol externo que se acumuló como resultado del incremento en la concentración de NaCl, encontramos que no siguió la misma cinética que el glicerol total e interno. De hecho, aunque no hubo diferencias significativas, el glicerol externo mostró una tendencia a disminuir conforme aumentaba la concentración de NaCl. Una explicación probable sería que esto se debió a un aumento de la absorción de glicerol mediada por la elevada actividad del simportador Stl1; sin embargo, hemos descartado esta posibilidad, ya que el perfil en el glicerol externo de la cepa mutante, donde la expresión de *DhSTL1* es insignificante, es casi idéntico al de la cepa WT. No obstante, es importante mencionar que *D. hansenii* puede acumular glicerol contra un fuerte gradiente de concentración (Adler et al., 1985). Si esto se debe solo a la actividad de *DhStl1* y/o a otros sistemas de transporte queda todavía por determinar. Otra posibilidad sería que la salida de glicerol sea un proceso de baja eficiencia en *D. hansenii*, debido a la falta de una acuagliceroporina canónica (Fps1 en *S. cerevisiae*) capaz de liberar glicerol bajo estrés hiperosmótico (Pettersson, Filipsson, Becit, Brive, & Hohmann, 2005; Sabir, Loureiro-Dias, &

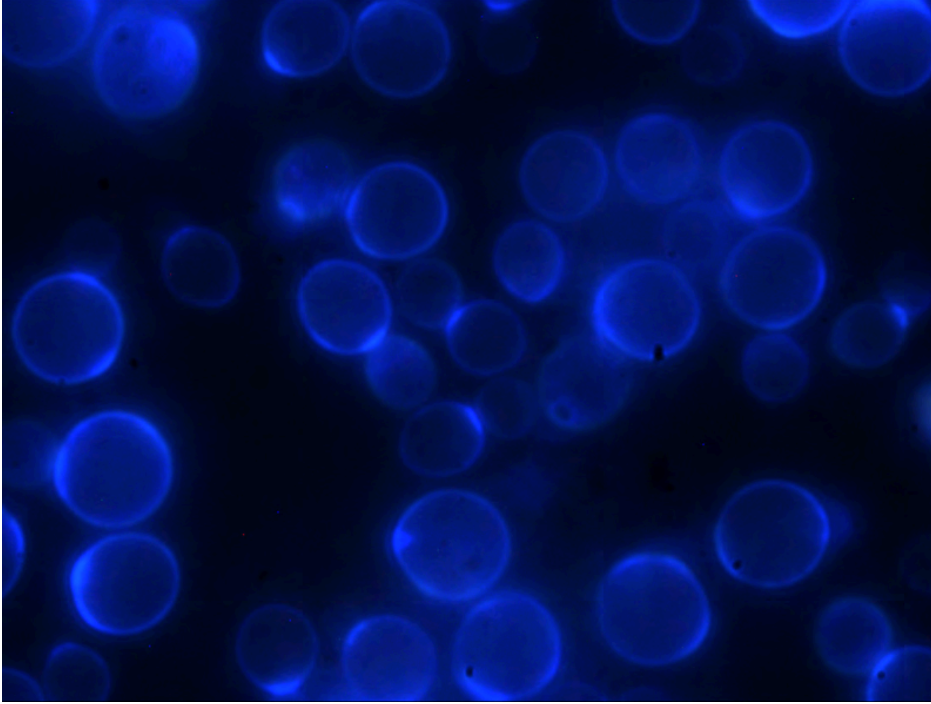
Prista, 2016). Vale la pena señalar, sin embargo, que *D. hansenii* tiene un gen que es ortólogo a las acuaporinas Aqy1 y Aqy2 de *S. cerevisiae*, que son canales ortodoxos de agua, que al parecer pueden transportar no solo agua, sino también solutos (Pettersson et al., 2005). Las acuaporinas se han estudiado poco en las levaduras. En *S. cerevisiae*, la expresión funcional de las acuaporinas depende en gran medida de la cepa. Cuando se expresan, parecen desempeñar un papel importante en la tolerancia a la congelación, pero ScAqy1 parece ser específico para la esporulación, mientras que ScAqy2 se expresa en células vegetativas, y es regulado negativamente por el estrés hiperosmótico, de manera Hog1-dependiente (Ahmadpour, Geijer, Tamás, Lindkvist-Petersson, & Hohmann, 2014). El genoma de *D. hansenii* parece codificar sólo para una acuaporina, que está más relacionada con ScAqy2 (Sabir et al., 2016). El que esta presunta acuaporina DhAqy2 participe en la regulación de la liberación de glicerol bajo estrés hiperosmótico en *D. hansenii* no se sabe y sería interesante averiguarlo, además de definir si su regulación es igual o diferente que en *S. cerevisiae*, y también determinar si DhAqy2 tiene alguna participación en la tolerancia al frío en *D. hansenii* detectada en este trabajo. Finalmente, la reducción en la concentración del glicerol total y externo observadas en concentraciones arriba de 2 M de NaCl coincide con la disminución del pico de fosforilación de DhHog1, y no se puede explicar como un mecanismo regulatorio llevado a cabo por DhHog1, sino más bien por una condición metabólica alterada debido al estrés hiperosmótico.

Además de su participación en la respuesta al estrés hiperosmótico, se ha demostrado que ScHog1 tiene actividades pleiotrópicas en varias condiciones; participa, por ejemplo, en la respuesta al estrés de retículo endoplásmico (RE) (Hernández-Elvira et al., 2019; Torres-Quiroz et al., 2010), en la respuesta general al estrés (de Nadal & Posas, 2010) y también en la mitofagia (Mao & Klionsky, 2011). De acuerdo con los resultados obtenidos, DhHog1 parece tener también un papel en la respuesta al estrés oxidante, lo cual concuerda con la inducción transcripcional de genes que intervienen en la protección contra el estrés oxidante, iniciada por el NaCl (Calderón-Torres, Castro, Montero, & Peña, 2011; Michán et al., 2013; Ramos-Moreno et al., 2019; Segal-Kischinevsky et al., 2011); DhHog1 podría también tener un papel en la respuesta al estrés de RE inducido por tunicamicina, que induce la N-glicosilación de las proteínas. Debido a que esta es una actividad de Hog1 fuera del núcleo (Hernández-Elvira et al., 2019; Torres-Quiroz et al., 2010), no es de sorprender que se haya detectado a DhHog1 en el citoplasma durante el estrés hiperosmótico. Nuestros resultados también sugieren que DhHog1 no participa en el estrés por frío ni en el estrés térmico. Aunque realizamos los experimentos en una amplia variedad de temperaturas, no descartamos la activación cruzada de DhHog1 por inducción simultánea de estrés por temperatura y estrés hiperosmótico u oxidante.

Un hallazgo interesante de este trabajo fue la alta sensibilidad que muestra la mutante *Dhhog1Δ* a la combinación de estrés hiperosmótico con alcalino. La resistencia de *D. hansenii* a condiciones alcalinas es una propiedad que se conoce muy bien desde las primeras cepas aisladas del océano, con un pH de alrededor de 8.0 (Norkrans, 1966, 1968), y también del reporte de otra cepa que ha sido aislada de salsa de soya con un pH de alrededor de 10 (Kurita & Yamazaki, 2002). En los ambientes naturales, donde coinciden varias condiciones estresantes de manera simultánea, el hallazgo de que Hog1 es esencial para contender con el estrés alcalino en una condición de estrés osmótico medianamente elevado, es muy relevante para entender las características fisiológicas de una levadura alcali-halotolerante. De hecho, se ha demostrado que *D. hansenii* tiene una alta capacidad de acidificar un medio amortiguado a pH 8.0 en presencia de una alta concentración de sal (Sánchez et al., 2018). Adicionalmente, *D. hansenii* expresa un antiportador catión-álcali-metálico/H<sup>+</sup> de amplio espectro (Ramos et al., 2011; Velkova & Sychrova, 2006) y dos Na<sup>+</sup>-ATPasas que se sobre-expresan en altas concentraciones de NaCl y, de hecho, una de ellas también en alto pH (Almagro, Prista, Benito, Loureiro-Dias, & Ramos, 2001; Sánchez et al., 2018). Parece así, que esta alcali-resistencia es al menos en parte regulada por la MAPK Hog1 en *D. hansenii*.

Nuestro estudio apunta a un escenario donde la vía HOG1 de *D. hansenii* es activada con elevada osmolaridad externa, y que, bajo condiciones de baja o mediana osmolaridad, otros sistemas de protección están activos. Algunos estudios han identificado factores que pueden participar en la halotolerancia de esta levadura, incluyendo el incremento en el ergosterol de la membrana plasmática en altas concentraciones de sal (Turk et al., 2007) y la inducción de la expresión y la actividad de algunos transportadores, como el simportador K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> (Martínez et al., 2011). Es así como los diversos mecanismos de osmo-regulación deben actuar de manera coordinada para permitir una adaptación celular en respuesta a los ambientes hipersalinos.

Hemos entonces, reportado por primera vez, la obtención de una mutante nula de *HOG1* por recombinación homóloga, un alcance técnico que había sido elusivo por muchos años. El número de células presuntamente mutadas que se hubo de aislar y analizar para obtener la mutante deseada, indica la poca frecuencia con que se logra una verdadera mutante. Es también importante que lográramos determinar el umbral de la concentración de sal que *D. hansenii* puede tolerar sin Hog1 y la contribución que esta MAPK tiene en la halotolerancia de esta especie.



*D. hansenii*, tinción de pared celular con calcoflúor, 100X.

## 7 CONCLUSIONES



## 7 CONCLUSIONES

- La ausencia de *DhHOG1* induce sensibilidad a las altas concentraciones de sal y sorbitol.
- La vía HOG de *D. hansenii* se activa preferentemente en una alta osmolaridad externa.
- *DhHog1* se transloca al núcleo por largo tiempo bajo un alto estrés salino, lo que concuerda con su grado de fosforilación y con la actividad esperada bajo esas condiciones, a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*.
- La concentración interna de glicerol como resultado de la exposición al estrés hipersalino depende parcialmente de *DhHOG1*.
  - Mientras que la expresión de *DhSTL1* depende totalmente de *DhHog1*, la expresión de *DhGPD1* dependiente de *DhHog1* fue del 60%.
  - Existen además componentes no transcripcionales, como la estimulación directa de la actividad de las enzimas encargadas de la producción de glicerol por el NaCl.
- Además de su participación en el estrés hiperosmótico, *DhHOG1* participa en la respuesta a los estreses oxidante, de retículo endoplásmico, e importantemente en el estrés alcalino en condiciones de mediana osmolaridad, pudiendo explicar en parte, la característica álcali-halotolerante de la levadura.
- La contribución que esta MAPK tiene en la halotolerancia de *D. hansenii* es importante; sin embargo, la acción conjunta con otros factores permite la supervivencia de la levadura en ambientes hipersalinos.
- Con todo esto, se comprobó la diferente funcionalidad de la MAPK *DhHog1*, de una levadura álcali-halotolerante comparada con *Hog1* de la levadura modelo *S. cerevisiae*, halosensible.



Tabla periódica monumental de la Facultad de Química, UNAM.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

## 8 BIBLIOGRAFÍA

- Adler, L., Blomberg, A., & Nilsson, A. (1985). Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Bacteriol.*, 162(1), 300–306. Retrieved from <http://j.b.asm.org/cgi/content/long/162/1/300>
- Adler, L., & Gustafsson, L. (1980). Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Archives of Microbiology*, 124(2), 123–130. <https://doi.org/10.1007/BF00427716>
- Aggarwal, M., Bansal, P. K., & Mondal, A. K. (2005). Molecular cloning and biochemical characterization of a 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase from *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*, 22(6), 457–470. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/yea.1223>
- Ahmadpour, D., Geijer, C., Tamás, M. J., Lindkvist-Petersson, K., & Hohmann, S. (2014). Yeast reveals unexpected roles and regulatory features of aquaporins and aquaglyceroporins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(5), 1482–1491. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.027>
- Alba-Lois, L., Segal, C., Rodarte, B., Valdés-López, V., DeLuna, A., & Cárdenas, R. (2004). NADP-Glutamate Dehydrogenase Activity Is Increased under Hyperosmotic Conditions in the Halotolerant Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Current Microbiology*, 48(1), 68–72. <https://doi.org/10.1007/s00284-003-4076-7>
- Almagro, A., Prista, C., Benito, B., Loureiro-Dias, M. C., & Ramos, J. (2001). Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Bacteriology*, 183(10), 3251–3255. <https://doi.org/10.1128/JB.183.10.3251-3255.2001>
- Almagro, Anabel, Prista, C., Castro, S., Quintas, C., Madeira-Lopes, A., Ramos, J., & Loureiro-Dias, M. C. (2000). Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 56(2), 191–197. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00220-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00220-8)
- André, L., Nilsson, A., & Adler, L. (1988). The Role of Glycerol in Osmotolerance of the Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology*, 134(3), 669–677. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-3-669>
- André, Lars, Hemming, A., & Adler, L. (1991). Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>). *FEBS Letters*, 286(1–2), 13–17. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80930-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80930-2)
- Ariño, J., Ramos, J., & Sychrová, H. (2010). Alkali Metal Cation Transport and Homeostasis in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 95–120. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00042-09>
- Bansal, P. K., & Mondal, A. K. (2000). Isolation and sequence of the HOG1 homologue from *Debaryomyces hansenii* by complementation of the *hog1Δ* strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 16(1), 81–88. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(20000115\)16:1<81::AID-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(20000115)16:1<81::AID-)

YEA510>3.0.CO;2-I

- Beyda, N. D., Chuang, S. H., Alam, M. J., Shah, D. N., Ng, T. M., McCaskey, L., & Garey, K. W. (2013). Treatment of *Candida famata* bloodstream infections: case series and review of the literature. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(2), 438–443. <https://doi.org/10.1093/jac/dks388>
- Blomberg, A. (1997). The Osmotic Hypersensitivity of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* is Strain and Growth Media Dependent: Quantitative Aspects of the Phenomenon. *Yeast*, 13(6), 529–539. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199705\)13:6<529::AID-YEA103>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199705)13:6<529::AID-YEA103>3.0.CO;2-H)
- Blomberg, A., & Adler, L. (1992). Physiology of Osmotolerance in Fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 33, 145–212. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60217-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60217-9)
- Brewster, J. L., & Gustin, M. C. (1994). Positioning of cell growth and division after osmotic stress requires a map kinase pathway. *Yeast*, 10(4), 425–439. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/yea.320100402>
- Cabrera-Orefice, A., Chiquete-Félix, N., Espinasa-Jaramillo, J., Rosas-Lemus, M., Guerrero-Castillo, S., Peña, A., & Uribe-Carvajal, S. (2014). The branched mitochondrial respiratory chain from *Debaryomyces hansenii*: Components and supramolecular organization. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837(1), 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.07.011>
- Cabrera-Orefice, A., Guerrero-Castillo, S., Díaz-Ruiz, R., & Uribe-Carvajal, S. (2014). Oxidative phosphorylation in *Debaryomyces hansenii*: Physiological uncoupling at different growth phases. *Biochimie*, 102(1), 124–136. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.03.003>
- Calahorra, M., Sánchez, N. S., & Peña, A. (2009). Activation of fermentation by salts in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 9(8). <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00556.x>
- Calderón-Torres, M., Castro, D. E., Montero, P., & Peña, A. (2011). DhARO4 induction and tyrosine nitration in response to reactive radicals generated by salt stress in *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*, 28(10), 733–746. <https://doi.org/10.1002/yea.1903>
- Carcía-Salcedo, R., Montiel, V., Calero, F., & Ramos, J. (2007). Characterization of DhKHA1, a gene coding for a putative Na<sup>+</sup> transporter from *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 7(6), 905–911. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00258.x>
- Casado, C., González, A., Platara, M., Ruiz, A., & Ariño, J. (2011). The role of the protein kinase A pathway in the response to alkaline pH stress in yeast. *The Biochemical Journal*, 438(3), 523–533. <https://doi.org/10.1042/BJ20110607>
- Chawla, S., Kundu, D., Randhawa, A., & Mondal, A. K. (2017). The serine/threonine phosphatase DhSIT4 modulates cell cycle, salt tolerance and cell wall integrity in halo tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Gene*, 606, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.12.022>
- Cong, Y. S., Yarrow, D., Li, Y. Y., & Fukuhara, H. (1994). Linear DNA plasmids from *Pichia etchellsii*, *Debaryomyces hansenii* and *Wingea robertsiae*. *Microbiology (Reading, England)*, 140 ( Pt 6(6), 1327–1335. <https://doi.org/10.1099/00221287-140-6-1327>

- DasSarma, S., & DasSarma, P. (2012). Halophiles. In *eLS* (formerly known as the Encyclopedia of Life Sciences).  
<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000394.pub3>
- de Nadal, E., Ammerer, G., & Posas, F. (2011). Controlling gene expression in response to stress. *Nature Reviews. Genetics*, *12*(12), 833–845.  
<https://doi.org/10.1038/nrg3055>
- de Nadal, E., & Posas, F. (2010). Multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases. *The EMBO Journal*, *29*(1), 4–13.  
<https://doi.org/10.1038/emboj.2009.346>
- de Nadal, E., Zapater, M., Alepuz, P. M., Sumoy, L., Mas, G., & Posas, F. (2004). The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes. *Nature*, *427*(6972), 370–374.  
<https://doi.org/10.1038/nature02258>
- Defosse, T. A., Courdavault, V., Coste, A. T., Clastre, M., de Bernonville, T. D., Godon, C., ... Papon, N. (2018). A standardized toolkit for genetic engineering of CTG clade yeasts. *Journal of Microbiological Methods*, *144*, 152–156.  
<https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2017.11.015>
- Dihazi, H., Kessler, R., & Eschrich, K. (2004). High osmolarity glycerol (HOG) pathway-induced phosphorylation and activation of 6-phosphofructo-2-kinase are essential for glycerol accumulation and yeast cell proliferation under hyperosmotic stress. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(23), 23961–23968.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M312974200>
- Dunayevich, P., Baltanás, R., Clemente, J. A., Couto, A., Sapochnik, D., Vasen, G., & Colman-Lerner, A. (2018). Heat-stress triggers MAPK crosstalk to turn on the hyperosmotic response pathway. *Scientific Reports*, *8*(1), 15168.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-33203-6>
- Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M. C., ... Brandt, A. (2005). A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H<sup>+</sup> symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(4), 2068–2076. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-10-0884>
- Ferrigno, P., Posas, F., Koepf, D., Saito, H., & Silver, P. A. (1998). Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *The EMBO Journal*, *17*(19), 5606–5614.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5606>
- Folch-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., & Covarrubias Robles, A. A. (2004). The stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, *46*(1–2), 24–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17061523>
- García-Salcedo, R., Casamayor, A., Ruiz, A., González, A., Prista, C., Loureiro-Dias, M. C., ... Ariño, J. (2006). Heterologous Expression Implicates a GATA Factor in Regulation of Nitrogen Metabolic Genes and Ion Homeostasis in the Halotolerant Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Eukaryotic Cell*, *5*(8), 1388 LP – 1398. <https://doi.org/10.1128/EC.00154-06>
- González-Hernández, J. C., Cárdenas-Monroy, C. A., & Peña, A. (2004). Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*, *21*(5), 403–412. <https://doi.org/10.1002/yea.1108>
- González-Hernández, J. C., Jiménez-Estrada, M., & Peña, A. (2005). Comparative

- analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress. *Extremophiles*, 9(1), 7–16. <https://doi.org/10.1007/s00792-004-0415-2>
- González-Hernández, Juan Carlos, & Peña, A. (2002). Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (levadura halófila). *Revista Latinoamericana de Microbiología*, Vol. 44, pp. 137–156.
- González, J., Castillo, R., García-Campos, M. A., Noriega-Samaniego, D., Escobar-Sánchez, V., Romero-Aguilar, L., ... Segal-Kischinevzky, C. (2020). Tolerance to Oxidative Stress in Budding Yeast by Heterologous Expression of Catalases A and T from *Debaryomyces hansenii*. *Current Microbiology*, 77(12), 4000–4015. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02237-3>
- Gori, K., Mortensen, H. D., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2005). Expression of the *GPD1* and *GPP2* orthologues and glycerol retention during growth of *Debaryomyces hansenii* at high NaCl concentrations. *Yeast*, 22(15), 1213–1222. <https://doi.org/10.1002/yea.1306>
- Guerrero, C. A., Aranda, C., DeLuna, A., Filetici, P., Riego, L., Anaya, V. H., & González, A. (2005). Salt-dependent expression of ammonium assimilation genes in the halotolerant yeast, *Debaryomyces hansenii*. *Current Genetics*, 47(3), 163–171. <https://doi.org/10.1007/s00294-004-0560-2>
- Gunde-Cimerman, N., Ramos, J., & Plemenitaš, A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research*, 113(11), 1231–1241. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.09.002>
- Gustafsson, L., & Norkrans, B. (1976). On the mechanism of salt tolerance. *Archives of Microbiology*, 110(2), 177–183. <https://doi.org/10.1007/BF00690226>
- Hérivaux, A., Lavín, J. L., de Bernonville, T. D., Vandeputte, P., Bouchara, J.-P., Gastebois, A., ... Papon, N. (2018). Progressive loss of hybrid histidine kinase genes during the evolution of budding yeasts (*Saccharomycotina*). *Current Genetics*, 64(4), 841–851. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0797-1>
- Hernández-Elvira, M., Martínez-Gómez, R., Domínguez-Martin, E., Méndez, A., Kawasaki, L., Ongay-Larios, L., & Coria, R. (2019). Tunicamycin Sensitivity-Suppression by High Gene Dosage Reveals New Functions of the Yeast Hog1 MAP Kinase. *Cells*, 8(7), 710. <https://doi.org/10.3390/cells8070710>
- Herrera, R., Salazar, A., Ramos-Moreno, L., Ruiz-Roldan, C., & Ramos, J. (2017). Vacuolar control of subcellular cation distribution is a key parameter in the adaptation of *Debaryomyces hansenii* to high salt concentrations. *Fungal Genetics and Biology*, 100, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.02.002>
- Hohmann, S. (2002). Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2), 300 LP – 372. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.2.300-372.2002>
- Hohmann, S. (2015). An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Current Genetics*, 61(3), 373–382. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0475-0>
- Holst, B., Lunde, C., Lages, F., Oliveira, R., Lucas, C., & Kielland-Brandt, M. C. (2000). *GUP1* and its close homologue *GUP2*, encoding multimembrane-spanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 37(1), 108–124. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01968.x>

- Igual, J. C., & Estruch, F. (2000). Signalling Stress in Yeast. *Food Technology and Biotechnology*.
- Kandasamy, K., Alikunhi, N. M., & Subramanian, M. (2012). Yeasts in marine and estuarine environments. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 3(6), 74–82. <https://doi.org/10.5897/JYFR12.003>
- Kejžar, A., Grötli, M., Tamás, M. J., Plemenitaš, A., & Lenassi, M. (2015). HwHog1 kinase activity is crucial for survival of *Hortaea werneckii* in extremely hyperosmolar environments. *Fungal Genetics and Biology*, 74, 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.11.004>
- Kinclova-Zimmermannova, O., & Sychrova, H. (2006). Functional study of the Nha1p C-terminus: involvement in cell response to changes in external osmolarity. *Current Genetics*, 49(4), 229–236. <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0050-1>
- Klein, M., Swinnen, S., Thevelein, J. M., & Nevoigt, E. (2017). Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. *Environmental Microbiology*, 19(3), 878–893. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13617>
- Krantz, M., Becit, E., & Hohmann, S. (2006). Comparative genomics of the HOG-signalling system in fungi. *Current Genetics*, 49(3), 137–151. <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0038-x>
- Kreger van Rij, N. J., & Veenhuis, M. (1975). Electron microscopy of ascus formation in the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of General Microbiology*, 89(2), 256–264. <https://doi.org/10.1099/00221287-89-2-256>
- Kretzschmar, A., Otto, C., Holz, M., Werner, S., Hübner, L., & Barth, G. (2013). Increased homologous integration frequency in *Yarrowia lipolytica* strains defective in non-homologous end-joining. *Current Genetics*, 59(1–2), 63–72. <https://doi.org/10.1007/s00294-013-0389-7>
- Kurita, O., & Yamazaki, E. (2002). Growth under alkaline conditions of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* IFO10939. *Current Microbiology*, 45(4), 277–280. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3735-4>
- Lages, F., Silva-Graça, M., & Lucas, C. (1999). Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: A study of 42 species. *Microbiology*, 145(9), 2577–2585. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-9-2577>
- Larsson, C., Morales, C., Gustafsson, L., & Adler, L. (1990). Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *Journal of Bacteriology*, 172(4), 1769–1774. <https://doi.org/10.1128/jb.172.4.1769-1774.1990>
- Lee, J., Reiter, W., Dohnal, I., Gregori, C., Beese-Sims, S., Kuchler, K., ... Levin, D. E. (2013). MAPK Hog1 closes the *S. cerevisiae* glycerol channel Fps1 by phosphorylating and displacing its positive regulators. *Genes & Development*, 27(23), 2590–2601. <https://doi.org/10.1101/gad.229310.113>
- Lopez, M. J., & Hall, C. A. (2020). Physiology, Osmosis. In *StatPearls*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32491541>
- Lu, F., Wang, Y., Bai, D., & Du, L. (2005). Adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to hyperosmotic and oxidative stress. *Process Biochemistry*, 40(11), 3614–3618.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.061>
- Lucas, C., Da Costa, M., & Van Uden, N. (1990). Osmoregulatory active sodium-glycerol co-transport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*, 6(3), 187–191. <https://doi.org/10.1002/yea.320060303>
- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, F., Prior, B. A., Ramos, J., Thevelein, J. M., & Hohmann, S. (1994). The *FPS1* gene product functions as a glycerol facilitator in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiologica*, 39(6), 534–536. <https://doi.org/10.1007/BF02814092>
- Maayan, I., Beenstock, J., Marbach, I., Tabachnick, S., Livnah, O., & Engelberg, D. (2012). Osmostress induces autophosphorylation of Hog1 via a C-terminal regulatory region that is conserved in p38 $\alpha$ . *PLoS One*, 7(9), e44749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044749>
- Mager, W. H., & Siderius, M. (2002). Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Research*, 2(3), 251–257. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00116-2)
- Mao, K., & Klionsky, D. J. (2011). MAPKs regulate mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy*, 7(12), 1564–1565. <https://doi.org/10.4161/auto.7.12.17971>
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, Vol. 5, pp. 73–83. <https://doi.org/10.1007/s007920100184>
- Martínez, J. L., Sychrova, H., & Ramos, J. (2011). Monovalent cations regulate expression and activity of the Hak1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(2), 177–184. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2010.06.013>
- Mattison, C. P., & Ota, I. M. (2000). Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast. *Genes and Development*, 14(10), 1229–1235. <https://doi.org/10.1101/gad.14.10.1229>
- Michán, C., Martínez, J. L., Alvarez, M. C., Turk, M., Sychrova, H., & Ramos, J. (2013). Salt and oxidative stress tolerance in *Debaryomyces hansenii* and *Debaryomyces fabryi*. *FEMS Yeast Research*, 13(2), 180–188. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12020>
- Miermont, A., Uhlenhof, J., McClean, M., & Hersen, P. (2011). The Dynamical Systems Properties of the HOG Signaling Cascade. *Journal of Signal Transduction*, 2011, 930940. <https://doi.org/10.1155/2011/930940>
- Minhas, A., Sharma, A., Kaur, H., Rawal, Y., Ganesan, K., & Mondal, A. K. (2012). Conserved Ser/Arg-rich Motif in PPZ Orthologs from Fungi Is Important for Its Role in Cation Tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, 287(10), 7301–7312. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.299438>
- Moore, J. C. (2013). Diversity, Taxonomic versus Functional. In S. A. B. T.-E. of B. (Second E. Levin (Ed.), *Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition)* (pp. 648–656). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00036-8>
- Morrison, D. K. (2012). MAP Kinase Pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11), a011254–a011254. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>
- Murakami, Y., Tatebayashi, K., & Saito, H. (2008). Two adjacent docking sites in



- the yeast Hog1 mitogen-activated protein (MAP) kinase differentially interact with the Pbs2 MAP kinase kinase and the Ptp2 protein tyrosine phosphatase. *Molecular and Cellular Biology*, 28(7), 2481–2494. <https://doi.org/10.1128/MCB.01817-07>
- Musa, H., Kasim, F. H., Nagoor Gunny, A. A., & Gopinath, S. C. B. (2018). Salt-adapted moulds and yeasts: Potentials in industrial and environmental biotechnology. *Process Biochemistry*, 69, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.03.026>
- Nadel, C. M., Mackie, T. D., & Gardner, R. G. (2019). Osmolyte accumulation regulates the SUMOylation and inclusion dynamics of the prionogenic Cyc8-Tup1 transcription corepressor. *PLOS Genetics*, 15(4), e1008115. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008115>
- Neves, L., Oliveira, R., & Lucas, C. (2004). Yeast orthologues associated with glycerol transport and metabolism. *FEMS Yeast Research*, 5(1), 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.06.012>
- Neves, M. L., Oliveira, R. P., & Lucas, C. M. (1997). Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology*, 143(4), 1133–1139. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-4-1133>
- Nishikawa, A., Tomomatsu, H., Sugita, T., Ikeda, R., & Shinoda, T. (1996). Taxonomic position of clinical isolates of *Candida famata*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 34(6), 411–419. <https://doi.org/10.1080/02681219680000731>
- Norkrans, B. (1966a). Studies on marine occurring yeasts: Growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Archiv Für Mikrobiologie*, 54(4), 374–392. <https://doi.org/10.1007/BF00406719>
- Norkrans, B. (1968). Studies on marine occurring yeasts: Respiration, fermentation and salt tolerance. *Archiv Für Mikrobiologie*, 62(4), 358–372. <https://doi.org/10.1007/BF00425641>
- Norkrans, B., & Kylin, A. (1969). Regulation of the Potassium to Sodium Ratio and of the Osmotic Potential in Relation to Salt Tolerance in Yeasts. *Journal of Bacteriology*, 100(2), 836–845. <https://doi.org/10.1128/JB.100.2.836-845.1969>
- O'Rourke, S. M., & Herskowitz, I. (2004). Unique and Redundant Roles for HOG MAPK Pathway Components as Revealed by Whole-Genome Expression Analysis. *Molecular Biology of the Cell*, 15(2), 532–542. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-07-0521>
- Ochoa, J., & Vázquez-Juárez, R. (2004). LAS LEVADURAS MARINAS COMO HERRAMIENTAS CIENTÍFICA Y BIOTECNOLÓGICA. *Universidad y Ciencia*, (1), 39–50. Retrieved from [www.ujat.mx/publicaciones/uciencia](http://www.ujat.mx/publicaciones/uciencia)
- Oguro, Y., Yamazaki, H., Ara, S., Shida, Y., Ogasawara, W., Takagi, M., & Takaku, H. (2017). Efficient gene targeting in non-homologous end-joining-deficient *Lipomyces starkeyi* strains. *Current Genetics*, 63(4), 751–763. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0679-6>
- Ōnishi, H. (1963). Osmophilic Yeasts. *Advances in Food Research*, 12, 53–94. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60006-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60006-3)
- Oren, A. (1999). Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 334–348. <https://doi.org/10.1128/mmbr.63.2.334->

348.1999

- Peña, A., Puyou, E., Cinco, G., Tuena, R. I., Gómez-Puyou, A., & Tuena, M. (1972). Effect of the pH of the Incubation Medium on *S. cerevisiae* Glycolysis and Respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 153(4), 413–425. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(72\)90359-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(72)90359-1)
- Peña, Antonio. (1975). Studies on the mechanism of K<sup>+</sup> transport in yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 167(2), 397–409. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(75\)90480-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(75)90480-4)
- Pereira, I., Madeira, A., Prista, C., Loureiro-Dias, M. C., & Leandro, M. J. (2014). Characterization of New Polyol/H<sup>+</sup> Symporters in *Debaryomyces hansenii*. *PLoS ONE*, 9(2), e88180. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088180>
- Pettersson, N., Filipsson, C., Becit, E., Brive, L., & Hohmann, S. (2005). Aquaporins in yeasts and filamentous fungi. *Biology of the Cell*, 97(7), 487–500. <https://doi.org/10.1042/bc20040144>
- Posas, F., Chambers, J. R., Heyman, J. A., Hoeffler, J. P., de Nadal, E., & Ariño, J. (2000). The Transcriptional Response of Yeast to Saline Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 275(23), 17249–17255. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910016199>
- Prista, C., Almagro, A., Loureiro-Dias, M. C., & Ramos, J. (1997). Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 4005–4009. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.10.4005-4009.1997>
- Prista, C., & Loureiro-Dias, M. C. (2007). *Debaryomyces hansenii*, a Salt Loving Spoilage Yeast. In *A Portrait of State-of-the-Art Research at the Technical University of Lisbon* (pp. 457–464). [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5690-1\\_28](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5690-1_28)
- Prista, C., Michán, C., Miranda, I. M., & Ramos, J. (2016). The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast (Chichester, England)*, 33(10), 523–533. <https://doi.org/10.1002/yea.3177>
- Proft, M., & Serrano, R. (1999). Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated ENA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Molecular and Cellular Biology*, 19(1), 537–546. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.1.537>
- Proft, M., & Struhl, K. (2004). MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell*, 118(3), 351–361. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.016>
- Qi, M. (2005). MAP kinase pathways. *Journal of Cell Science*, 118(16), 3569–3572. <https://doi.org/10.1242/jcs.02470>
- Ramos-Moreno, L., Ramos, J., & Michán, C. (2019). Overlapping responses between salt and oxidative stress in *Debaryomyces hansenii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(11), 170. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2753-3>
- Ramos, J., Ariño, J., & Sychrová, H. (2011). Alkali-metal-cation influx and efflux systems in nonconventional yeast species. *FEMS Microbiology Letters*, 317(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02214.x>
- Rep, M., Albertyn, J., Thevelein, J. M., Prior, B. A., & Hohmann, S. (1999). Different signalling pathways contribute to the control of *GPD1* gene

- expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 145(3), 715–727. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-3-715>
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J. M., & Hohmann, S. (2000). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8290–8300. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8290>
- Rigoulet, M., Yoboue, E. D., & Devin, A. (2011). Mitochondrial ROS Generation and Its Regulation: Mechanisms Involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(3), 459–468. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3363>
- Rodríguez-González, M., Kawasaki, L., Velázquez-Zavala, N., Domínguez-Martín, E., Trejo-Medecigo, A., Martagón, N., ... Coria, R. (2017). Role of the Sln1-phosphorelay pathway in the response to hyperosmotic stress in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Molecular Microbiology*, 104(5), 822–836. <https://doi.org/10.1111/mmi.13664>
- Rodríguez de Mier, S. F. P. (2011). *Systems and synthetic biology studies in Saccharomyces cerevisiae*. Retrieved from <https://www.tdx.cat/handle/10803/37475#page=1>
- Ruiz, A., González, A., García-Salcedo, R., Ramos, J., & Ariño, J. (2006). Role of protein phosphatases 2C on tolerance to lithium toxicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 62(1), 263–277. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05370.x>
- Sabir, F., Loureiro-Dias, M. C., & Prista, C. (2016). Comparative analysis of sequences, polymorphisms and topology of yeasts aquaporins and aquaglyceroporins. *FEMS Yeast Research*, 16(3), fow025. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow025>
- Saito, H., & Posas, F. (2012). Response to Hyperosmotic Stress. *Genetics*, 192(2), 289 LP – 318. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.140863>
- Sánchez, N. S., Calahorra, M., González-Hernández, J. C., & Peña, A. (2006). Glycolytic sequence and respiration of *Debaryomyces hansenii* as compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 23(5), 361–374. <https://doi.org/10.1002/yea.1360>
- Sánchez, Norma Silvia, Arreguín, R., Calahorra, M., & Peña, A. (2008). Effects of salts on aerobic metabolism of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 8(8), 1303–1312. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00426.x>
- Sánchez, Norma Silvia, Calahorra, M., Ramírez, J., & Peña, A. (2018). Salinity and high pH affect energy pathways and growth in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Biology*, 122(10), 977–990. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.07.002>
- Schaber, J., Baltanas, R., Bush, A., Klipp, E., & Colman-Lerner, A. (2012). Modelling reveals novel roles of two parallel signalling pathways and homeostatic feedbacks in yeast. *Molecular Systems Biology*, 8(1), 622. <https://doi.org/10.1038/msb.2012.53>
- Schmitt, M. E., Brown, T. A., & Trumppower, B. L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 18(10), 3091–3092. <https://doi.org/10.1093/nar/18.10.3091>
- Schorsch, C., Köhler, T., & Boles, E. (2009). Knockout of the DNA ligase IV

- homolog gene in the sphingoid base producing yeast *Pichia ciferrii* significantly increases gene targeting efficiency. *Current Genetics*, 55(4), 381–389. <https://doi.org/10.1007/s00294-009-0252-z>
- Segal-Kischinevsky, C., Rodarte-Murguía, B., Valdés-López, V., Mendoza-Hernández, G., González, A., & Alba-Lois, L. (2011). The Euryhaline Yeast *Debaryomyces hansenii* has Two Catalase Genes Encoding Enzymes with Differential Activity Profile. *Current Microbiology*, 62(3), 933–943. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9806-z>
- Seiler, H., & Busse, M. (1990). The yeasts of cheese brines. *International Journal of Food Microbiology*, 11(3–4), 289–303. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(90\)90022-W](https://doi.org/10.1016/0168-1605(90)90022-W)
- Serra-Cardona, A., Canadell, D., & Ariño, J. (2015). Coordinate responses to alkaline pH stress in budding yeast. *Microbial Cell*, 2(6), 182–196. <https://doi.org/10.15698/mic2015.06.205>
- Serrano, Ramón, & Rodríguez-Navarro, A. (2001). Ion homeostasis during salt stress in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(4), 399–404. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00227-1](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00227-1)
- Serrano, Raquel, Martín, H., Casamayor, A., & Ariño, J. (2006). Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slt2 MAPK pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 39785–39795.
- Serrano, Raquel, Ruiz, A., Bernal, D., Chambers, J. R., & Ariño, J. (2002). The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Molecular Microbiology*, 46(5), 1319–1333. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03246.x>
- Sharma, P., Meena, N., Aggarwal, M., & Mondal, A. K. (2005). *Debaryomyces hansenii*, a highly osmo-tolerant and halo-tolerant yeast, maintains activated Dhog1p in the cytoplasm during its growth under severe osmotic stress. *Current Genetics*, 48(3), 162–170. <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0010-9>
- Sharma, P., & Mondal, A. K. (2005). Evidence that C-terminal non-kinase domain of Pbs2p has a role in high osmolarity-induced nuclear localization of Hog1p. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328(4), 906–913. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2005.01.039>
- Tamás, M. J., Luyten, K., Sutherland, F. C. W., Hernandez, A., Albertyn, J., Valadi, H., ... Hohmann, S. (2002). Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Molecular Microbiology*, 31(4), 1087–1104. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01248.x>
- Tanaka, K., Tatebayashi, K., Nishimura, A., Yamamoto, K., Yang, H.-Y., & Saito, H. (2014). Yeast Osmosensors Hkr1 and Msb2 Activate the Hog1 MAPK Cascade by Different Mechanisms. *Science Signaling*, 7(314), ra21 LP-ra21. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004780>
- Tatebayashi, K., Tanaka, K., Yang, H.-Y., Yamamoto, K., Matsushita, Y., Tomida, T., ... Saito, H. (2007). Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *The EMBO Journal*, 26(15), 3521–3533. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601796>
- Tekaia, F., Blandin, G., Malpertuy, A., Llorente, B., Durrens, P., Toffano-Nioche,

- C., ... Dujon, B. (2000). Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 3. Methods and strategies used for sequence analysis and annotation. *FEBS Letters*, 487(1), 17–30. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02274-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02274-2)
- Thomé-Ortiz, P. E., Peña, A., & Ramírez, J. (1998). Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentrations of KCl and NaCl. *Yeast*, 14(15), 1355–1371. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199811\)14:15<1355::AID-YEA331>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199811)14:15<1355::AID-YEA331>3.0.CO;2-0)
- Thomé, P. E. (2004). Isolation of a *GPD* gene from *Debaryomyces hansenii* encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>). *Yeast*, 21(2), 119–126. <https://doi.org/10.1002/yea.1070>
- Thomé, P. E. (2005). Heterologous expression of glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene [*DhGPD1*] from the osmotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-4446-4>
- Thomé, P. E., & Trench, R. K. (1999). Osmoregulation and the Genetic Induction of Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase by NaCl in the Euryhaline Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Marine Biotechnology*, 1(3), 230–238. <https://doi.org/10.1007/PL00011772>
- Torres-Quiroz, F., García-Marqués, S., Coria, R., Randez-Gil, F., & Prieto, J. A. (2010). The activity of yeast Hog1 MAPK is required during endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin exposure. *Journal of Biological Chemistry*, 285(26), 20088–20096. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.063578>
- Turk, M., Montiel, V., Žigon, D., Plemenitaš, A., & Ramos, J. (2007). Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. *Microbiology*, 153(10), 3586–3592. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/009563-0>
- Van der Walt, J. P., Taylor, M. B., & Liebenberg, N. V. (1977). Ploidy, ascus formation and recombination in *Torulaspora (Debaryomyces) hansenii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 43(2), 205–218. <https://doi.org/10.1007/BF00395675>
- Van Wuytswinkel, O., Reiser, V., Siderius, M., Kelders, M. C., Ammerer, G., Ruis, H., & Mager, W. H. (2000). Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway. *Molecular Microbiology*, 37(2), 382–397. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02002.x>
- Vázquez-Ibarra, A., Rodríguez-Martínez, G., Guerrero-Serrano, G., Kawasaki, L., Ongay-Larios, L., & Coria, R. (2020). Negative feedback-loop mechanisms regulating HOG- and pheromone-MAPK signaling in yeast. *Current Genetics*, 66(5), 867–880. <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01089-5>
- Vázquez-Ibarra, A., Subirana, L., Ongay-Larios, L., Kawasaki, L., Rojas-Ortega, E., Rodríguez-González, M., ... Coria, R. (2018). Activation of the Hog1 MAPK by the Ssk2/Ssk22 MAP3Ks, in the absence of the osmosensors, is not sufficient to trigger osmostress adaptation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Journal*, 285(6), 1079–1096. <https://doi.org/10.1111/febs.14385>
- Velázquez-Zavala, N., Rodríguez-González, M., Navarro-Olmos, R., Ongay-Larios, L., Kawasaki, L., Torres-Quiroz, F., & Coria, R. (2015). Ineffective

- phosphorylation of mitogen-activated protein kinase Hog1p in response to high osmotic stress in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryotic Cell*, 14(9), 922–930. <https://doi.org/10.1128/EC.00048-15>
- Velkova, K., & Sychrova, H. (2006). The *Debaryomyces hansenii* *NHA1* gene encodes a plasma membrane alkali-metal-cation antiporter with broad substrate specificity. *Gene*, 369(1–2), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.10.007>
- Westfall, P. J., Patterson, J. C., Chen, R. E., & Thorner, J. (2008). Stress resistance and signal fidelity independent of nuclear MAPK function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(34), 12212–12217. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805797105>
- Wong, B., Kiehn, T. E., Edwards, F., Bernard, E. M., Marcove, R. C., de Harven, E., & Armstrong, D. (1982). Bone infection caused by *Debaryomyces hansenii* in a normal host: a case report. *Journal of Clinical Microbiology*, 16(3), 545–548. <https://doi.org/10.1128/JCM.16.3.545-548.1982>
- Yamamoto, K., Tatebayashi, K., & Saito, H. (2016). Binding of the Extracellular Eight-Cysteine Motif of Opy2 to the Putative Osmosensor Msb2 Is Essential for Activation of the Yeast High-Osmolarity Glycerol Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 36(3), 475–487. <https://doi.org/10.1128/MCB.00853-15>



## 9 ANEXOS METODOLÓGICOS

# 9 ANEXOS METODOLÓGICOS

## 9.1 ANEXO 1

### Extractos proteicos para Western blot

#### REACTIVOS

Buffer de lisis SB 5X con DTT	<u>30 mL</u>	<u>10 mL</u>
250 mM Tris, pH 6.8 ___ (Stock 1.5 M) ___	5 mL	1.66 mL
0.5M DTT _____	2.3 g	0.766 g
10% SDS _____	3 g	1 g
20% Glicerol _____	6 mL	2 mL
0.5% azul de bromofenol _____	0.15 g	0.05 g

#### Se utiliza 1X :

- 1.5 mL Tris 1.5M, pH 6.8
- 1.0 mL buffer de lisis **5X**
- 2.5 mL agua
- guardar en el refri a 4°C

TCA (Ácido Tricloroacético) al 85% (8.5 g aforando a 10 mL)

#### PROCEDIMIENTO

- Sembrar la levadura a evaluar en 10 mL (o 50 mL, ver más adelante) de YPD
- Al día siguiente, checar  $DO_{600\text{ nm}}$  con blanco de YPD (diluir 1:2, 0.5mL + 0.5 mL o 1:100 si está muy cargado: 2.97 mL + 0.03 mL)
- Ajustar 50 mL de YPD (en un matraz de 125 mL) a 0.5  $UDO_{600\text{ nm}}$  e incubar por 3 horas a 30 °C (aquí depende de cuántas muestras se van a preparar, si son más, poner 100 mL o si son menos: pueden ser tubos cónicos de 50 mL con 20 mL de cultivo a 0.5  $UDO_{600\text{ nm}}$ , depende de qué tantas condiciones se vayan a usar)
- Mientras, rotular tubos cónicos de 15 mL y microtubos cónicos de polipropileno de 1.5 mL con cada condición que se va a probar
- Transferir 15 mL del cultivo (para *Dh* y 5 mL para *Sc*) de 3 h a cada tubo cónico y centrifugar. Desechar el sobrenadante. Conservar la pastilla



- En los microtubos, colocar 1.05 mL de cada medio que se va a probar; ejemplos:
  - Para *Sc*: YPD y YPD + 0.5 M NaCl
  - Para *Dh*: YPD y YPD + NaCl desde 0 a 2.5 M
- En el cuarto de temperatura constante (a 28 °C) colocar los microtubos con los medios en una gradilla a que se atemperen unos 10 min. Llevar el vórtex al cuarto
- Colocar los tubos cónicos con las pastillas en el tambor rotatorio
- Ir adicionando el medio a cada pastillas y desfazarlos al menos 30 seg para que, terminando el tiempo de incubación (usualmente 10 min, si es que no se va a hacer una cinética), agregar 300 µL de TCA al 85%
- Incubar 10 min a temperatura ambiente
- Transferir a microtubos de 1.5 mL
- Lavar en la microfuga 2 veces con 1 mL de agua estéril
- Añadir 100 µL de buffer de lisis SB 1X
- Añadir aprox. 0.32 g de perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro (previamente lavadas con HCl 1N, enjuagadas varias veces y estériles) OJO: las perlas se pueden pesar previamente en otros microtubos y solo vaciarlas directamente en el que se va necesitando.
- Romper en el vórtex 4 veces: 2 X 2 min (con descanso de 2 min en hielo)
- Voltear el microtubo (de tal manera que el líquido y las perlas se vayan hacia la tapa) y perforar la base del tubo con una aguja caliente. Colocarlo sobre otro microtubo y centrifugar con un mini spin (sin la tapa de la microfuga porque no cierra)
- Calentar en Termoblock a 95 °C por 5 min
- Centrifugar 5 min en la microfuga a 13000 rpm para eliminar agregados proteicos
- Recuperar el sobrenadante en microtubos limpios
- Congelar a -18°C.

Para cargar las muestras en el gel SDS-PAGE:

- Descongelarlas en hielo
- Cargar en el gel 20 µL de muestra para *D. hansenii* y 3-5 µL de muestra para *S. cerevisiae*
- Correr el gel 2 h- 2:20 h a 90 Volts
- Transferir a membrana 75 min a 100 V por 1h 30 min
- Continuar con protocolo para inmunodetección.

## 9.2 ANEXO 2

### Electrotransferencia del gel de proteína a membrana para Western blot y revelado.

#### MATERIALES:

- Membrana de PVDF  
Immobilon-P  
Millipore, No. de Catálogo: IPVH00010 o el IPVH08100 (ya precortadas)  
De 26.5cm x 3.75 m  
0.45  $\mu$ m de poro
- Papel filtro Whatman 3mm

#### EQUIPO:

- Mini Trans-Blot de Biorad
- Fuente de poder Biorad
- Placa agitadora orbital
- Agitador magnético
- Escáner de luminiscencia C-DiGit *Blot Scanner* de LI-COR

#### REACTIVOS:

- **BLOT (Amortiguador de transferencia)**

Tris 25mM \_\_\_\_\_ 3.0285g  
Glicina 0.2M \_\_\_\_\_ 15.014 g  
Metanol 20% \_\_\_\_\_ 200 mL  
pH 8.5 (no es necesario ajustarlo)  
H<sub>2</sub>O \_\_\_\_\_ cbp 1L

- **PBS 10X**

NaCl 1.5M \_\_\_\_\_ 43.83g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM \_\_\_\_\_ 7.1 g  
Ajustar pH con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M (6.9g / 50 mL) a 7.2  
H<sub>2</sub>O \_\_\_\_\_ cbp 500 mL  
Alicuotar en tubos cónicos de 50 mL y congelar.

Para preparar PBS 1X, descongelar a temperatura ambiente y aforar a 500 mL con agua desionizada.

- **PBS 1X + Tween 20\_ 0.1%**

Agregar 227µL de Tween 20 a 250 mL de PBS 1X

- **Leche descremada al 7% en PBS 1X (Difco Skim Milk 232100)**

### PROCEDIMIENTO:

Utilizar guantes en todo momento

- Cortar la membrana del tamaño del gel (8 x 5 cm)
- Cortar 4 papeles filtro Whatman del tamaño del gel, colocar en amortiguador Blot, así como las esponjas que vienen en el equipo de electrotransferencia
- Separar el gel de los vidrios y colocar en amortiguador Blot a que se equilibre por 15 min en la placa agitadora orbital
- Colocar la membrana en metanol por 30 seg, luego en agua desionizada por 1 minuto y luego en Blot por 15 min para que se equilibre también.
- Hacer un “sandwich” como se indica en la [figura A2.1](#):

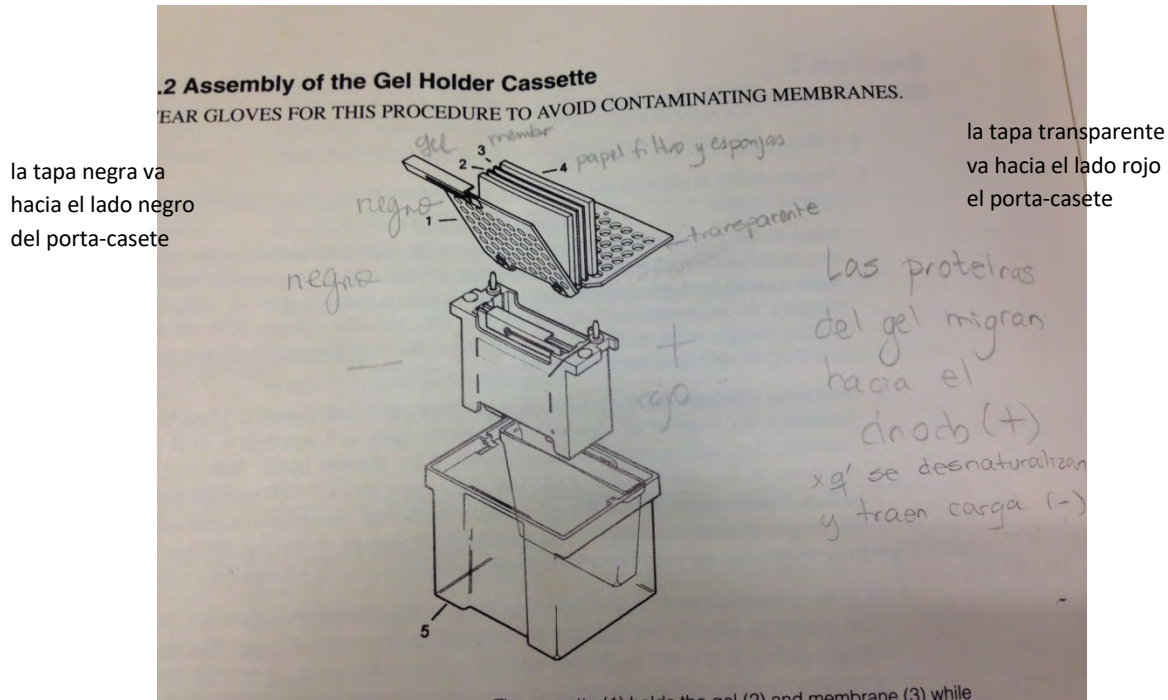
(+)

\_\_\_\_\_ - esponja  
\_\_\_\_\_ - papel filtro  
\_\_\_\_\_ - membrana  
\_\_\_\_\_ - gel  
\_\_\_\_\_ - papel filtro  
\_\_\_\_\_ - esponja

(-)

[Figura A2.1](#) Ejemplo de cómo acomodar el “sandwich” para realizar la transferencia del gel de proteínas a la membrana de PVDF

Armar el (los) cassette (s) de acuerdo a la [Figura A2.2](#) (no olvidar el contenedor de hielo y la barra magnética para agitar el amortiguador en el tanque).



[Figura A2.2](#). Armado del equipo de electrotransferencia.

- Llenar la cámara con amortiguador Blot hasta la primera línea de “círculos” de las paredes del cassette  
Transferir por 75 min a 100 Volts.
- Colocar todo el equipo en una palangana con hielo y agua y éstos sobre un agitador magnético que soporte el peso

En este caso se utilizó el equipo Mini Trans-Blot de Biorad, para hacer una transferencia húmeda.

- Al terminar, enjuagar rápidamente la membrana en agua desionizada 2 veces para quitar todo el metanol
- Colocar la mambrana en un contenedor de plástico con 10 mL de leche descremada al 7% (en PBS 1X, sin Tween 20) por 30 minutos en agitación para bloquearla

- Adicionar el anticuerpo primario de acuerdo a la siguiente tabla:

**Tabla A2.1**

**Volúmenes de anticuerpo para la inmunodetección de Hog1 total y Hog1 fosforilada (P-p38)**

	Anti Hog1 (Y-215)	Anti P- p38 monoclonal
<i>D. hansenii</i>	10 µL (para 20 µL de extracto celular cargado en el gel) (1:1000)	10 µL (1:1000)
<i>S. cerevisiae</i>	5 µL (para 5 µL de extracto celular cargado en el gel) (1:5000)	10 µL (1:1000)

El anticuerpo anti-Hog1 utilizado fue el y-215 de Santa Cruz Biotechnology y el anti- Hog1 fosforilada fue el anticuerpo contra p38 fosforilada de Cell Signaling Technology, (*Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP Rabbit mAb #4511*).

- Incubar en el cuarto frío toda la noche en la placa agitadora orbital en un contenedor en el cual se pueda verificar que se cubra toda la membrana. Opcionalmente, y para ahorrar anticuerpos, se puede recortar la membrana como una tira en el nivel que se espera la proteína de interés y colocar la tira de membrana en un tubo cónico de 15 mL. Ponerle 7 mL de leche descremada al 7% en PBS 1X sin Tween 20, con su anticuerpo.

## **Revelado de la membrana después de la electrotransferencia del gel de proteínas.**

Terminando la incubación de toda la noche con el anticuerpo primario:

- Recuperar la leche con el anticuerpo primario. Se puede volver a utilizar una vez más (no dura más de 3 días en refrigeración)

- Realizar un lavado rápido con PBS 1X adicionado con 0.1% de Tween 20 (solución de lavado) en un contenedor de plástico
- Hacer 2 lavados de 10 min en la placa agitadora orbital

### **INCUBAR CON EL ANTICUERPO SECUNDARIO:**

Adicionar el anticuerpo secundario a una concentración de 1: 10,000 (1 µL en 10 mL de leche descremada al 7% en PBS 1X **sin** Tween). Para cualquiera de los dos anticuerpos primarios usados, el anti-Hog1 y-215 o el anti-Pp38, se requiere usar un anticuerpo secundario de anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (*Goat anti-rabbit Igg H+L coupled to HRP, 1 mg, Invitrogen\_Accesolab, Cat. No. G-21234*).

- Incubar 1 h a temperatura ambiente en la placa agitadora orbital
- Lavar la membrana como se mencionó anteriormente en un contenedor de plástico. Dejarla con aprox. 5 mL de PBS 1X

### **REVELADO**

- Colocar 1 mL de sustrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y 1 mL de luminol (WBKLS0500 Millipore, sustrato Immobilon quimoluminiscente de HRP para transferencias "Western") en otro contenedor o caja oscura. Colocar la membrana con unas pinzas y dejarla 1 min
- Poner unos 500 µL de la mezcla de sustrato-luminol encima del cristal del C-DiGit y colocar la membrana con las pinzas boca abajo (viendo hacia el vidrio)
- Activar la función Hi.
- Guardar la imagen y analizarla con el programa Image Studio lite.

### **STRIPPING.**

Cuando se va a utilizar la misma membrana para visualizar tanto Hog1 total como Hog1 fosforilada, lo conveniente es primero revelar a Hog1 fosforilada (porque podría degradarse la fosforilación) y después Hog1 total. Para ello, después de revelar la primera proteína, se tiene que “desnudar” la membrana de acuerdo al siguiente protocolo:

- Después de revelar, lavar la membrana con agua e incubarla a 60°C (en el horno de hibridación, con agitación leve) durante 20 min en solución de *stripping*:

### **SOLUCIÓN DE STRIPPING:**

100 mM 2-mercaptoetanol \_\_\_\_\_ 0.704 mL del 14.2 M de Biorad  
62.5 mM Tris pH 6.8 \_\_\_\_\_ 4.16 mL del stock 1.5 M  
SDS 2% \_\_\_\_\_ 2 g  
Aforar con agua destilada \_\_\_\_\_ 100 mL

Esto se hace para eliminar el anticuerpo que haya quedado pegado a la membrana.

Posterior a la incubación con la solución de *stripping*, lavar la membrana:

- 2 lavados rápidos con agua destilada
- 3 lavados de 15 min con agua destilada en la placa de agitación orbital
- 2 lavados rápidos con PBS 1X adicionado con 0.1% de Tween 20
- 3 lavados de 15 min con PBS 1X adicionado con 0.1% de Tween 20 en la placa de agitación orbital
  
- Bloquear 30 min con 10 mL de la solución de leche descremada al 7% en un contenedor de plástico y agitar en la misma placa
- Incubar con el anticuerpo primario.
- Dejar toda la noche a 4 °C en agitación
- Repetir lo del anticuerpo secundario y revelado.

## 9.3 ANEXO 3

### Observación de células etiquetadas con yeYFP en curva de tiempo con sal

**Importante:** Poner siempre un control negativo: WT y un control positivo: *Dhhog1Δ* (que ya hemos comprobado que expresa bien a la proteína YFP). Establecer con la cepa *Dhhog1Δ* el tiempo de exposición adecuado para que salga bien la foto. En el caso del microscopio Labophot de Nikon, son como 800 msec. Checar bien este tiempo en cada microscopio.

Se pueden checar las clonas desde los parches, tomando solo un poco de muestra con un palillo y resuspendiendo en 30  $\mu$ L de agua. Si la clona no da una señal adecuada en 800 msec y se "blanquea", no sirve. Seguir buscando.

Ya que se tienen a las clonas candidatas:

- Precultivo de 18-24 h de una asada de la clona de interés en 50 mL de YPD
- Preparar una suspensión de 1 UDO<sub>600 nm</sub> en 100 mL de YPD e incubar 3 horas a 30° C en agitación
- Centrifugar en 2 tubos cónicos de 50 mL (para no tener que hacerlo en botellas de 250 mL). Juntar en uno con 20 mL de YPD
- Tomar 1 mL de la suspensión de 20 mL y añadirlos a 150  $\mu$ L de formaldehído (37 %) en un microtubo de 1.5 mL (este es el tiempo 0 min)
- Centrifugar de nuevo la suspensión de 20 mL (-1) y resuspender con 19 mL de YPD con 2 M de NaCl (previamente atemperado a 30 °C). Puede ser en el mismo tubo cónico de 50 mL ¡TOMAR TIEMPO!
- Poner en agitación en el cuarto de 30 °C y tomar muestras de 1 mL a los 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120 y 180 min
- Colocar ese 1 mL en microtubos a los que previamente se les colocaron 150  $\mu$ L de formaldehído. Incubar 15 min a temperatura ambiente
- Lavar 3 veces con 1 mL de PBS centrifugando en la microfuga 3 min a 13,000 rpm (no dejar que se junten todos, ir lavando cada uno a su tiempo)
- Dejar en 1 mL de PBS, y al día siguiente:
- Centrifugar, resuspender en 200  $\mu$ L de PBS y añadir 60  $\mu$ L de DAPI 300 nM. Incubar 30 min en la obscuridad a temperatura ambiente y lavar 2 o 3 veces con PBS. Resuspender en 100  $\mu$ L de PBS (o en el volumen mínimo que dé una turbidez adecuada de células para observar al microscopio).



- Al observar al microscopio de epifluorescencia, primero ajustar la iluminación Köhler. Usar el filtro adecuado para la proteína amarilla fluorescente.
- Utilizar aprox. 4-5  $\mu\text{L}$  para colocar en el portaobjetos de preferencia, previamente tratados con polilisina, para que se adhieran bien las células al colocar el cubreobjetos y no se muevan para que sea más fácil el enfoque.

## 9.4 ANEXO 4

### Extracción de RNA total de Levadura

Método modificado a partir de (Schmitt et al., 1990)

#### PREPARATIVOS:

- Colocar la microcentrífuga en el cuarto frío
- Todos los reactivos deben ser preparados con mucho cuidado para no contaminar con RNAsas y deben ser esterilizados conforme se indica en la lista de reactivos
- Puntas para micropipeta estériles y de preferencia con filtro
- Limpiar muy bien la mesa de trabajo y desinfectar con etanol al 70%
- Trabajar con guantes en todo momento, evitar tocar otras superficies y si es necesario, cambiar los guantes.

#### REACTIVOS:

DEPC	Sigma D5758-50mL
<i>Phenol Solution pH 4.3</i>	Sigma P4682-100mL
<i>Formaldehyde Solution 36.5-38%</i>	Sigma F8755-500 mL
<i>Phenol/ Chloroform/ isoamyl alcohol</i> (25:24:1) pH 8	Research Organics 0641P

#### Preparar:

- H<sub>2</sub>O con DEPC (1mL DEPC/ 1 L agua) se deja agitando fuertemente al menos durante 2 horas. Esterilizar por 45 min. **TODOS LOS REACTIVOS SE DISUELVEN EN AGUA CON DEPC.**
- SDS 10% \_\_\_\_\_ 1 g/ 10 mL esterilizado por filtración
- Acetato de Na 3 M pH 5.2 (c/ ác. acético) \_\_\_\_\_ 4.08 g (**trihidratado**) / 10 mL. En baño María disolver poco a poco y esterilizar en autoclave.
- EDTA (sal de sodio) 100 mM \_\_\_\_\_ 0.7444 g en 20 mL
- Buffer AE: Acetato de Na 3 M \_\_\_\_\_ 166 µL  
EDTA 100mM \_\_\_\_\_ 1 mL  
H<sub>2</sub>O DEPC \_\_\_\_\_ 8.83 mL

1. Realizar un precultivo con una asada de la levadura en 25 mL de YPD hasta fase de crecimiento pre-estacionaria (alrededor de 16 h para *D. hansenii*).
2. Resembrar en 100 mL de YPD a una  $DO_{600nm}$  entre **0.05** y **0.1** y crecer hasta una DO entre **0.5 a 0.8**. Colocar en hielo.
3. Si las células vienen de cultivo líquido se centrifugan a 1,500 rpm por 5 min, se desecha el sobrenadante y al paquete celular se le adiciona 1 mL de buffer AE a 4°C (CH<sub>3</sub>COONa 50mM y EDTA 10 mM).
4. Si las células se toman de caja directamente, se escoge una colonia grande (0.5 cm diámetro) y se pone en 1 mL de H<sub>2</sub>O con DEPC se centrifugan (13,000 rpm, 2 min) y se lavan 1 vez con 1 mL de H<sub>2</sub>O-DEPC. Se desecha el sobrenadante y las células se congelan en N<sub>2</sub> líquido y se dejan a -70°C. Cuando se quieran utilizar se descongelan en hielo y se les añade 1 mL de buffer AE a 4°C.
5. A un tubo de tapón de rosca, tipo criotubo de 2 mL, añadir perlas de vidrio (de 0.45 mm de diámetro, estériles) a un volumen igual que el paquete celular, 450 µL de fenol ácido (agitando continuamente el contenido del frasco con la barra magnética en el agitador) y 40 µL de SDS al 10% y colocar el tubo a 65°C en el termoblock.
6. Las células ya resuspendidas en AE se centrifugan 5 seg en la microfuga y se resuspenden en 500 µL de buffer AE, añadir 5 µL de DEPC y agitar en el vórtex 5 seg. Pasar esta suspensión al tubo con perlas/fenol/SDS.
7. Agitar el tubo con el vórtex por 30 seg, luego ponerlo a 65°C por 5 min (abrir tantito el tubo junto al mechero para que salgan los vapores) agitar en vórtex por 30 seg, ponerlo otros 5 min a 65°C (abrirlo/vapores), volver a agitar en vórtex 30 seg, ponerlo otra vez 5 min a 65°C (abrirlo/vapores), volver a agitar en vórtex 30 seg (3 x 30 seg). Congelar el tubo 3 min en N<sub>2</sub> líquido o 5 min en hielo seco /etanol o en el Revco a -70 °C (OJO: si es en hielo seco-etanol, tener cuidado con las etiquetas porque se despintan).
8. Centrifugar a 14,000 rpm por 5 min en la microfuga. Transferir fase acuosa (parte superior) a un microtubo de 1.5 mL nuevo (si no se descongeló, dejarlos 10 min en la microfuga que está en el cuarto frío y centrifugarlo otra vez a 14,000 por 5 min). Añadir 500 µL de fenol/cloroformo/isoamílico (el frasco tiene una barra magnética para agitar la suspensión continuamente, para que no se dividan las capas) y agitar en vórtex 15 seg.

9. Centrifugar en microfuga (14,000 rpm, 5 min). Transferir fase acuosa (parte superior) a un microtubo nuevo. Añadir 500  $\mu$ L de fenol/cloroforno/isoamílico (agitándolo nuevamente) y agitar en vórtex 15 seg CON MUCHO CUIDADO DE QUE NO SE TIRE.
10. Centrifugar en microfuga (14000 rpm, 5 min). Transferir fase acuosa (parte superior, MEDIR CUÁNTO ES) a un microtubo nuevo. Precipitar el RNA con 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol frío (para biología molecular al 95 o 100%). Se puede repartir en dos tubos si se tiene mucho volumen final. Agitar cuidadosamente con la punta de la micropipeta subiéndolo y bajándolo la solución. Dejar al menos 30 min a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Si es posible, mejor dejarlo toda la noche porque hay más rendimiento.
11. Aun congelados centrifugar 15 min a 14000 rpm, desechar el sobrenadante y lavar el precipitado con 1 mL de etanol al 75% frío (JUNTAR TODO EN UN TUBO). Agitar solo por inversión (si está muy compacto, se puede desbaratar un poco con la punta de la micropipeta y subir y bajar la solución para resuspender). Este paso se puede repetir una vez más dependiendo para que se quiera el RNA; si se necesita muy puro, por ejemplo, para RT-qPCR, conviene lavarlo una vez más. Centrifugar 3 min a 14,000 rpm y dejar evaporar el etanol por 5 min (desechar el etanol y secarle la última gota con una toallita y dejar los tubos en una gradilla parados destapados junto al mechero).
12. Resuspender en  $\text{H}_2\text{O}$  con DEPC  $\sim 28 \mu\text{L}$  (dejar hidratar un poco y luego homogenizar con la punta de la micropipeta) y guardar a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Son 3  $\mu\text{L}$  para el gel. OPCIÓN: Si se quiere para qPCR, resuspender mejor en 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC y purificar con RNeasy Mini kit de Qiagen. Eluir al final con aprox. 33  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC y alícuotar en tubitos de 10  $\mu\text{L}$ : Guardar en el REVCO.

Nota: el protocolo sirve bien para células provenientes de un cultivo de 50 a 100 mL de YPD. Si es más hay que escalar los volúmenes.

El DNA contaminante se elimina por digestión con DNasa I (Invitrogen 18068015 o Promega M6101). Se usa como pre- tratamiento si en el gel se ve una mancha hasta arriba. Eso es DNA. El tratamiento se hace justo antes de usar el RNA para la RT-qPCR. Se sigue el protocolo que viene con la DNasa.

Hay esta opción también si se va a hacer RT-qPCR:

*RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor* Invitrogen, Cat. no. 10777019

*Applications:*

**cDNA Synthesis.** *When added to the reaction mixture (40 units/20  $\mu\text{L}$  of reaction mixture), RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor protects mRNA and improves total cDNA yields including percent total full length of cDNA.*

*RT-PCR RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor is compatible with all enzymes used in RT-PCR. It has been used with the Elongase® Enzyme Mix in long RT-PCR mixture (40 units/20 µL of reaction mixture).*

## Gel desnaturalizante para electroforesis de RNA

Todo se prepara en H<sub>2</sub>O con DEPC

### MAE 10 X (en agua con DEPC)

Acetato de Na 50 mM \_\_\_\_\_ 1.7 g (trihidratado)  
EDTA (sal de sodio) 10 mM \_\_\_\_\_ 0.93 g  
MOPS 0.2M \_\_\_\_\_ 10.46 g (Sigma M 3183)  
pH 7 con NaOH 10M  
H<sub>2</sub>O-DEPC \_\_\_\_\_ cbp 250 mL  
ESTERILIZAR POR FILTRACIÓN (Membrana 0.22 µm)

### GEL (50 mL)

H<sub>2</sub>O-DEPC \_\_\_\_\_ 43.2 mL  
Agarosa \_\_\_\_\_ 0.5 g  
MAE 10X (Frío) \_\_\_\_\_ 5 mL  
Se disuelve en el microondas y una vez tibio se agrega:  
Formaldehído \_\_\_\_\_ 3 mL (Sigma F1635 ó F 8775)

### BUFFER DE CORRIDA

MAE 10X \_\_\_\_\_ 28 mL  
Formaldehído \_\_\_\_\_ 8.4 mL  
H<sub>2</sub>O-DEPC \_\_\_\_\_ 243.6 mL  
Mantener en el refrigerador

### SOLUCIÓN TAMPÓN (Caducidad 3 MESES)

Formamida desionizada (se almacena en refrigeración) \_\_\_\_ 550µL (Sigma F 9037)  
Formaldehído \_\_\_\_\_ 200µL  
MAE 10X \_\_\_\_\_ 120 µL  
Glicerol al 80% \_\_\_\_\_ 100µL (en H<sub>2</sub>O-DEPC y estéril)  
Azul de bromofenol al 2% \_\_\_\_\_ 25µL (en H<sub>2</sub>O-DEPC 0.02g/mL)

Guardar en el congelador.

Lavar la cámara, charola, peines y remojar todo en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluido al 3% por mínimo 10 min. Enjuagar con H<sub>2</sub>O-DEPC.

### **MUESTRA**

Muestra \_\_\_\_\_ 3 µL (aprox. 10 µg totales)

Tampón \_\_\_\_\_ 12 µL

Bromuro de etidio \_\_\_\_\_ 0.6 µL (stock 10 mg/mL)

Se calienta en baño María a 65 °C por 10 min y se carga el gel.

### **CONDICIONES DE CORRIMIENTO:**

90 volts, 50 min a 1 h. Se puede correr sin el marcador de peso molecular y se puede incluir una muestra de RNA control conocido.



**10 ARTÍCULO DE INVESTIGACION  
PUBLICADO**

*Contribution of the mitogen-activated protein kinase Hog1 to the halotolerance of the marine yeast *Debaryomyces hansenii**

**Norma Silvia Sánchez, Martha Calahorra, James González, Tatiana Defosse, Nicolas Papon, Antonio Peña & Roberto Coria**

**Current Genetics**

Microorganisms and Organelles

ISSN 0172-8083

Volume 66

Number 6

Curr Genet (2020) 66:1135-1153

DOI 10.1007/s00294-020-01099-3



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**



# Contribution of the mitogen-activated protein kinase Hog1 to the halotolerance of the marine yeast *Debaryomyces hansenii*

Norma Silvia Sánchez<sup>1</sup> · Martha Calahorra<sup>1</sup> · James González<sup>2</sup> · Tatiana Defosse<sup>3</sup> · Nicolas Papon<sup>3</sup> · Antonio Peña<sup>1</sup> · Roberto Coria<sup>1</sup>

Received: 5 June 2020 / Revised: 10 July 2020 / Accepted: 17 July 2020 / Published online: 27 July 2020  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

## Abstract

Halotolerant species are adapted to dealing continually with hyperosmotic environments, having evolved strategies that are uncommon in other organisms. The HOG pathway is the master system that regulates the cellular adaptation under these conditions; nevertheless, apart from the importance of *Debaryomyces hansenii* as an organism representative of the halotolerant class, its HOG1 pathway has been poorly studied, due to the difficulty of applying conventional recombinant DNA technology. Here we describe for the first time the phenotypic characterisation of a null *HOG1* mutant of *D. hansenii*. *Dhhog1Δ* strain was found moderately resistant to 1 M NaCl and sensitive to higher concentrations. Under hyperosmotic shock, DhHog1 fully upregulated transcription of *DhSTL1* and partially upregulated that of *DhGPD1*. High osmotic stress lead to long-term inner glycerol accumulation that was partially dependent on DhHog1. These observations indicated that the HOG pathway is required for survival under high external osmolarity but dispensable under low and mid-osmotic conditions. It was also found that DhHog1 can regulate response to alkali stress during hyperosmotic conditions and that it plays a role in oxidative and endoplasmic reticulum stress. Taken together, these results provide new insight into the contribution of this MAPK in halotolerance of this yeast.

**Keywords** HOG pathway · Glycerol · Transcription regulation · Stl1 symporter · Gpd1 · Alkali-halotolerant · Oxidative stress · ER stress

Communicated by M. Kupiec.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00294-020-01099-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Norma Silvia Sánchez  
nsanchez@ifc.unam.mx

✉ Roberto Coria  
rcoria@ifc.unam.mx

<sup>1</sup> Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México City, CDMX, México

<sup>2</sup> Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México City, CDMX, México

<sup>3</sup> Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, GEIHP, EA 3142, SFR ICAT 4208, UNIV Angers, UNIV Brest, Institut de Biologie en Santé, IRIS, CHU Angers, Angers, France

## Introduction

*Debaryomyces hansenii* (anamorph: *Candida famata*) is a halotolerant yeast able to grow in the presence of high NaCl concentrations. This yeast can tolerate as much as 4 M of salt, while the growth of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* is completely inhibited with 1.7 M NaCl (Onishi 1963; Prista et al. 2016). Originally isolated from seawater (Norkrans 1966), *D. hansenii* can also be found in salty and fermented foods with high osmolarity (Gori et al. 2012; Ramos et al. 2017). Importantly and due to its ability to inhibit fungal growth, this yeast species can be employed in the prevention of food contamination (Medina-Córdova et al. 2018).

The halotolerant behaviour of *D. hansenii* is the result of several properties acting in concert. These include its particular potassium and sodium homeostasis (Norkrans 1966, 1968), its membrane composition (sterol-to-phospholipid ratio) (Turk et al. 2007), the presence of glycerol and alkali-metal-cation transporters (Prista et al. 1997, 2016; Lages

et al. 1999; Ramos et al. 2011; Martínez et al. 2011; Michán et al. 2013), the resistance of some enzymes to salt stress or expression induced by high salt concentrations (Alba-Lois et al. 2004; Sharma et al. 2005; Guerrero et al. 2005; Minhas et al. 2012; Chawla et al. 2017), and energy obtaining pathways that are optimised in the presence of salts (Sánchez et al. 2006, 2008; Calahorra et al. 2009; Cabrera-Orefice et al. 2014a, b) among others.

Highly-active glycerol uptake for the maintenance of an adequate intracellular concentration is one of the main processes that characterises halotolerant species (Lages et al. 1999). Indeed, in *D. hansenii*, as in many yeast species, glycerol has been found to be a preferential compatible solute (Gustafsson and Norrans 1976; André et al. 1988; Larsson et al. 1990); however, *D. hansenii* is also able to efficiently produce trehalose or arabinitol as compatible solutes under high salt concentration (Adler and Gustafsson 1980; Blomberg and Adler 1992; González-Hernández et al. 2005). The intracellular level of glycerol depends on its synthesis, utilisation and transport, responding to various stress solutes besides NaCl, i.e. KCl, sucrose or Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (André et al. 1988; Neves et al. 1997). The main metabolic pathways (Adler et al. 1985; André et al. 1988) and the transport systems (Lages et al. 1999; Neves et al. 2004; Klein et al. 2017) involved in glycerol metabolism in *D. hansenii* are similar to those present in *S. cerevisiae*, with the exception of the occurrence of a *D. hansenii* Na<sup>+</sup>/glycerol symporter that can also use potassium ions to internalise glycerol (Lucas et al. 1990).

Upon hyperosmotic stress, glycerol synthesis in *S. cerevisiae* as well as in other eukaryotic cells is mainly driven by the HOG1 (High Osmolarity Glycerol) pathway. The exposure to hyperosmotic stress triggers this MAPK pathway, which comprises two sub-pathways: the SHO1 and the SLN1 branches. Each one, by means of a cascade of progressive phosphorylations, activates the Hog1 protein, which internalises into the nucleus and triggers the transcription of genes needed to cope with the osmotic stress, especially those encoding enzymes for the synthesis and accumulation of glycerol (de Nadal et al. 2002; Saito and Posas 2012; Hohmann 2015).

*DhGPD1*, the gene encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase, which catalyses the first step in glycerol synthesis, was identified, isolated and heterologously expressed in a *gpd1Δ* strain of *S. cerevisiae*. It was found that hyperosmotic stress activated the transcription of *DhGPD1* gene, restoring glycerol production in the *Scgpd1Δ* mutant, responding to the induction exerted by the native ScHog1 (Thomé and Trench 1999; Thomé 2004, 2005). In addition, the regulation of *DhGPD1* and *DhGPP2* genes was analysed in comparison to that of their orthologous in *S. cerevisiae* grown under different NaCl concentrations, and it was confirmed that these genes are

upregulated upon hyperosmotic stress and that they play a significant role in the NaCl tolerance of *D. hansenii* (Gori et al. 2005).

Saline tolerance is also achieved by the activity of several ion transporters located at the plasma membrane of yeast cells, including uniporters such as Trk1, antiporters such as Nha1 and the Na<sup>+</sup>-ATPase Ena1 (Ariño et al. 2019). It has been determined that osmotic stress induced by high sodium concentration, increases the transcriptional activity of the *ENA1* gene in *S. cerevisiae* in a Hog1 dependent manner (Marquez and Serrano 1996). Transcription of the orthologues *ENA1* and *ENA2* genes of *D. hansenii* is also increased in high salt concentrations and at least for *ENA2* with high pH (Almagro et al. 2001).

At the present time, the HOG1 pathway of *D. hansenii* has yet to be described. The only reports published include the cloning and sequencing of the *DhHOG1* gene and its heterologous expression in a *S. cerevisiae hog1Δ* mutant (Bansal and Mondal 2000) and a study of the cellular localisation of DhHog1 after hyperosmotic treatment (Sharma et al. 2005). In the former report, the expressed *D. hansenii* gene conferred to the *S. cerevisiae hog1Δ* mutant the ability to grow under hyperosmotic stress and to induce glycerol overproduction. In the latter report, it was observed that phosphorylated DhHog1 had a delayed entry into the *D. hansenii* nucleus and was exported back in the cytoplasm after exposure to severe saline stress in a phosphorylated state. In this study, it was also shown that UV light and oxidative stress additionally induce DhHog1 phosphorylation.

*D. hansenii* belongs to the monophyletic clade that ambiguously translates CTG into Ser and Leu (Tekaiia et al. 2000; Fitzpatrick et al. 2006; Papon et al. 2014). Besides the existence of some reports describing the DNA transformation of *D. hansenii* (Ricaurte and Govind 1999; Voronovsky et al. 2002; Minhas et al. 2009), gene modification using the conventional tools of molecular biology has been challenging in this yeast (Gerami-Nejad et al. 2009). It has been argued that this may be due to its robust cell wall (Gezelius and Norrans 1970), or because it has a highly-efficient Non-Homologous End Joining (NHEJ) repair system, which does not allow deletion or modification of a gene of interest.

Given the important role that the HOG1 pathway plays in the halotolerance behavior, in the present study we report for the first time its inactivation by deletion of the *DhHOG1* gene in *D. hansenii*. This was achieved using a suitable plasmid, specially constructed for genetic manipulation of the CTG clade yeast (Defosse et al. 2018). The phenotypical and physiological characteristics of this mutant (*Dhhog1Δ*) were investigated so that we might be able to understand the role of Hog1 in *D. hansenii*'s halotolerance behaviour as well as to other stresses. We found that DhHog1 was required for survival to high external osmolarity by regulating the expression of genes required for glycerol accumulation and

it also has a role in the response to alkali, oxidative and endoplasmic reticulum stresses.

## Materials and methods

### Strains, plasmids and culture media

*D. hansenii* Y7426 was kindly donated by the US Department of Agriculture, Peoria, Illinois, USA. *Dhhog1Δ* (*hog1Δ::SAT1-yeYFP1*) is isogenic to strain Y7426 and its construction is depicted in Fig. 3a. *S. cerevisiae* BY4742 (*MATα*, *his3-Δ1*, *leu2-Δ0*, *lys2-Δ0*, *ura3-Δ0*) and its isogenic *hog1Δ* strain (*MATα*, *his3-Δ1*, *leu2-Δ0*, *lys2-Δ0*, *ura3-Δ0*, *hog1Δ::kanMX*) were obtained from the Yeast Knockout Collection.

Yeast cells were routinely grown at 28 °C in YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose). For mutant selection and maintenance, YPD was supplemented with 150 μg/ml nourseothricin (clonNAT) (Werner BioAgents GmbH, Germany). Modifications to the media and temperatures are indicated in figure legends of each experiment.

*Escherichia coli* DH5α strain was used to propagate plasmids. Bacteria were grown at 37 °C in LB (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) containing 100 μg/ml ampicillin for plasmid selection.

The pAYCU244 vector (*P<sub>DhTEF1</sub>-SAT1-T<sub>M8</sub>PGKI-P<sub>M8</sub>ACT1-yeYFP-T<sub>M8</sub>TRP1*), especially adapted to *D. hansenii* (Defosse et al. 2018) was used for yeast transformation. The pGEM-T Easy vector (Promega™) was used for cloning and sequencing of PCR products.

### Growth assays

Growth curves were determined in YPD medium supplemented with the indicated NaCl concentrations using 250 ml nephelometric flasks. Cultures were incubated at 28 °C with shaking at 250 rpm. OD readings were obtained every hour using a Klett-Summerson colorimeter. Klett units were converted to OD<sub>540</sub> by multiplying by 0.002. Equations for linear regressions were calculated at the exponential growth interval in each condition. The relative growth was then calculated as the slope value in each condition in proportion to the slope value of the zero-NaCl condition in each species.

Growth on YPD plates supplemented by the indicated NaCl concentrations (or the indicated oxidative and ER stress agents) was performed by spotting tenfold serial dilutions. Cells were grown overnight in YPD liquid medium and the OD<sub>600</sub> was adjusted to 1.0. Dilution series were prepared in YPD and aliquots were spotted onto agar plates. Plates were incubated at 28 °C for 48 h and photographed. When required, incubation temperature and time were modified as indicated.

### Gene cloning and disruption

The *DhHOG1* gene was amplified by PCR using primers *DhHog1F* and *DhHog1R* (Table S1) and genomic *D. hansenii* DNA as a template. The PCR product was cloned into the pGEM-T Easy Vector.

The *D. hansenii hog1Δ* mutant was constructed by homologous recombination using a PCR amplicon containing the *SAT1-yeYFP* cassette and HOG1 recombinant ends (Fig. 3a). The PCR amplicon was synthesised using the hybrid oligonucleotides *Dhhog1Δp244hyb\_F* and *R* (Table S1) and the pAYCU244 plasmid as a template.

### DhHog1-yeYFP fusion

*DhHOG1* tagging with the yeast enhanced Yellow Fluorescent Protein (*yeYFP*) sequence was achieved by successive PCR reactions using plasmid pAYCU244 as starting template (Fig. 3a). A PCR reaction was designed to fuse the *yeYFP* ORF in frame with the 3' end of *DhHOG1*, and to eliminate the *HOG1* stop codon at the same time. A separate PCR reaction was carried out to fuse the *SAT1* terminator region with the *DhHOG1* 3' UTR. These two PCR products were fused in a third PCR reaction that yielded an amplicon of 2899 bp containing 120 bp of the *DhHOG1* 3' ORF, followed by the *yeYFP* gene (with the *TRP1* terminator), the *SAT1* gene (flanked by the *TEF1* promoter and the *PGK* terminator) and 120 bp of the *DhHOG1* 3' UTR. The primers used for the PCR reactions are listed in Table S1. The PCR product was sequenced and used for yeast transformation.

### Yeast transformation

*D. hansenii* cells were grown in 10 ml YPD for 24 h. 1 ml of this culture was used to inoculate 50 ml of YPD and allowed to grow for 24 h. Cells were harvested by centrifugation (4500g, 10 min, RT), suspended in 6 ml of 50 mM phosphate buffer pH 7.5 to which fresh 25 mM DTT was added, and incubated at 30 °C for 15 min. After centrifugation (4000g, 10 min, 4 °C), cells were washed twice with 20 ml ice-cold water, once with 20 ml ice-cold 1 M sorbitol, and finally harvested by centrifugation (4000g, 10 min, 4 °C). Cells were resuspended in 3 ml ice-cold 1 M sorbitol. 1 μg DNA (suspended in 10 μl water) was added to a 200 μl cell suspension and transferred to a 0.2 cm gap width electroporation cuvette. A BioRad gene pulser was used for electroporation with an electric pulse of 2.3 kV, 25 μF and 200 ohms. The cells were immediately washed out from the cuvette with 1 ml YPD. This cell suspension was used to inoculate 10 ml of YPD and incubated for 24 h (28 °C, 150 rpm) to allow cell regeneration. 100 μl were plated onto YPD supplemented with 150 μg/ml clonNAT and incubated at 28 °C until colonies appeared (2–3 days). Transformants were

transferred to fresh YPD plus 150 µg/ml of clonNAT and analysed for DNA integration.

### Phosphorylation assays and immunoblotting

Western blots were performed as reported by Vázquez-Ibarra et al. (2018). Cells grown overnight in YPD were collected, washed, resuspended in fresh medium and treated with different concentrations of NaCl for different periods of time (as indicated in each figure). Cells were fixed with 85% trichloroacetic acid for 10 min at room temperature (RT) and washed twice with 1 ml water. Cells were lysed with SB-DTT buffer and glass beads as previously described (Velázquez-Zavala et al. 2015). Protein samples (20 µl of cell-free extracts for *D. hansenii* and 3 to 5 µl for *S. cerevisiae*) were resolved by SDS/PAGE and transferred to an Immobilon polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Edo. de México, México). Immunoblotting was performed using anti-Hog1 (1:1000 y-215; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) for total Hog1 detection, and anti-phospho-p38 (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) for phospho-Hog1 detection. Reconstituted goat anti-rabbit HRP antibody from Invitrogen, G21234 (0.1 mg/ml in 50% glycerol-PBS, 1:10,000) was used as a secondary antibody. Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore, MA., USA) was used to detect the chemiluminescence. All western blots were repeated three times and representative blots are shown in figures.

### Fluorescence microscopy

Cells containing the integrative SAT1-yeYFP cassette into the *DhHOG1* locus were grown overnight in YPD plus 150 µg/ml clonNAT. Cells were harvested and washed with water and observed with an LSM 710-Zeiss microscope with the Zen black 2.3 software. Images were obtained by confocal microscopy in the double photon mode. yeYFP was detected at 514–527 nm, excitation and emission wavelengths respectively.

The DhHog1-yeYFP fusion was detected in cells grown overnight in YPD, collected and suspended at  $OD_{600} = 1.0$ . Cells were then centrifuged and resuspended in fresh YPD plus 2 M NaCl and incubated at 28 °C. 1 ml samples were taken at different times and fixed with 150 µl 37% formaldehyde for 15 min. Fixed cells were pelleted and washed three times with 1 ml PBS. For nucleus staining, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) was added at a final concentration of 90 nM, incubated for 30 min in the dark at RT, washed three times with PBS and suspended in 100 µl PBS. yeYFP was visualised using a NIKON epifluorescence microscope with a green filter. Images were taken and processed using QCapture Pro (version 6.0) software.

### Measurements of glycerol production

Overnight cultures were used to prepare 2.0  $OD_{600}$  suspensions in YPD. For each experimental sample, 10 ml of the suspension were centrifuged and re-suspended in 5 ml of fresh YPD supplemented or not with the indicated NaCl concentrations and incubated for 4 h in a rotator at 28 °C. For determination of external glycerol, 1 ml of each suspension was centrifuged at 1625g and the supernatant kept on ice. For total glycerol, 1 ml of each suspension was boiled for 15 min in capped tubes, placed on ice for 10 min, vortexed for 2 min and centrifuged; glycerol content was determined in 10 µl of each supernatant with the enzymatic Glycerol kit (Boehringer Mannheim/R-Biopharm) and adapted to be performed in 96 well plates. A POLARstar Omega microplate reader was used for measurement of absorbance at 340 nm. Glycerol content was normalised to the yeast dry weight of each sample. The internal glycerol was calculated by means of the subtraction of the external glycerol value from the total glycerol value in each condition. Data shown are average values  $\pm$  SD. Every sample was measured in duplicate from 3 biological replicates.

### RNA extraction

Overnight cultures of wild type *D. hansenii* and *Dhhog1Δ* mutant were adjusted to 0.5  $OD_{600}$  in 100 ml YPD media and incubated for 3 h at 28 °C with shaking. 50 ml of each culture was centrifuged (5 min, 1750g) and resuspended in 10 ml of YPD supplemented or not with 2 M NaCl and incubated for 60 min under the same conditions. After incubation, cells were centrifuged and resuspended in 1 ml of AE buffer (50 mM sodium acetate and 10 mM EDTA) to perform the RNA extraction protocol according to Schmitt et al. (1990). RNA integrity was verified by electrophoresis in a 1% denaturing agarose gel.

### Analysis of gene expression

Total RNA was digested with DNaseI (RQ1 RNase-Free DNase, Promega) to remove any contaminating genomic DNA. cDNA synthesis reactions were performed using the ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega kit). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed using the standard curve method with specific primers for the genes *DhGPD1* (ID: 2903610), *DhSTL1* (ID: 2902951) and *DhACT1* (ID: 2901278), encoding putative  $NAD^+$ -dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, the glycerol/ $H^+$  symporter of the plasma membrane and actin, respectively. Oligonucleotides were initially screened for the absence of dimers formation and cross-hybridisation. Oligonucleotide primer pairs with 100% of amplification efficiencies were used (Table S1). Control reactions without

reverse transcriptase were performed. qRT-PCR analysis was performed using a Rotor-Gene Q (Qiagen) machine. The detection dye used was SYBR Green (2×SYBR Select Mastermix from Applied Biosystems). qRT-PCR was carried out as follows: 95 °C for 5 min (1 cycle), 95 °C for 15 s, 58 °C for 20 s, and 72 °C for 20 s (35 cycles). Transcripts were normalised relative to the *DhACT1* transcript quantities. Relative expression levels (fold induction) were evaluated with respect to wild type cells (control) by the standard curve method. Data shown are the mean values ±SD of four biological replicates.

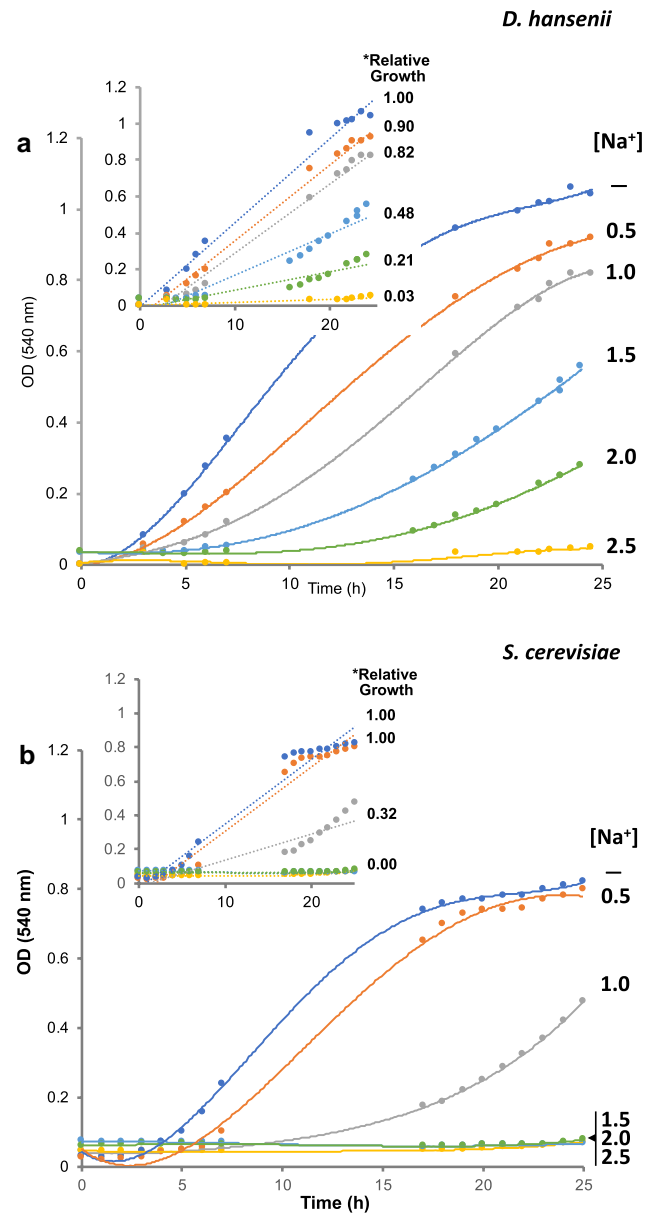
## Results

### Determination of the halotolerance level of *D. hansenii*

To determine the maximum NaCl tolerance of *D. hansenii*, we established growth curves in YPD medium supplemented with different salt concentrations. To get a clear idea of the salt resistance of *D. hansenii*, this and the following experiments were conducted in comparison to the halosensitive *S. cerevisiae* strain. Due to the preferred respiratory metabolism of *D. hansenii* (Sánchez et al. 2008), the growing parameters were obtained in well-aerated flasks, to ensure optimal O<sub>2</sub> availability. We detected that as the NaCl concentration increased, the growth velocity of both strains decreased (Fig. 1); however, 1 M NaCl only showed a moderate effect on the *D. hansenii* growth (Fig. 1a) in contrast to *S. cerevisiae*, which at such concentration had a severe growth defect (Fig. 1b). This is more clearly observed when comparing the relative growth values (obtained with the slope of the linear regression) (Fig. 1, inserts). The *S. cerevisiae* growth was reduced by 70% at 1 M NaCl, while the same NaCl concentration decreased growth by only 20% in *D. hansenii*. At higher NaCl concentrations, *S. cerevisiae* did not grow, while *D. hansenii* was still able to divide. 50% reduction in *D. hansenii* growth velocity was detected with a NaCl concentration as high as 1.5 M. Although 2 M NaCl displayed a significant effect on the growth properties of *D. hansenii*, it accumulated biomass and reached the stationary phase in twice the time it took the culture with no salt (not shown). These observations indicate that *D. hansenii* can grow adequately in NaCl concentrations that are harmful to *S. cerevisiae* and that under these growth conditions it can tolerate as much as 2 M NaCl.

### Kinetics of DhHog1 phosphorylation upon NaCl treatment

In *S. cerevisiae*, hyperosmotic stress leads to the activation of the HOG pathway through transient phosphorylation of



**Fig. 1** Growth curves of *Debaryomyces hansenii* (a) and *Saccharomyces cerevisiae* (b) under different NaCl concentrations. Cultures were grown in YPD with the indicated NaCl concentrations, at 28 °C, in a rotary shaker at 250 rpm. The initial inoculum with freshly harvested overnight YPD cells, was adjusted to 0.1 OD<sub>600</sub>. OD readings were taken every hour in a Klett- Summerson colorimeter. Linear regressions were adjusted, and the relative growth was calculated with the slope values normalised to the condition with zero NaCl. A representative graph of 3 different biological replicas is shown

the Hog1 MAPK. The time-lapse of phosphorylated Hog1 depends on the severity of the hyperosmotic stimulus, for instance ranging from 40 to 60 min under moderate stress conditions (0.4 to 0.6 M NaCl) (Van Wuytswinkel et al. 2000; Vázquez-Ibarra et al. 2018). To analyse the contribution of Hog1 to the salt tolerance of *D. hansenii*, we

determined the phosphorylation kinetics of DhHog1 in NaCl concentrations where the cell growth was either unaffected or compromised. DhHog1 phosphorylation was monitored with an anti-phospho-p38 antibody that detects the dually phosphorylated form. When *D. hansenii* cells were exposed to increasing NaCl concentrations for 10 min, DhHog1 was barely phosphorylated at 0.3 M, but this gradually increased until a maximum plateau was reached at 1–2 M (Fig. 2a). Although DhHog1 phosphorylation dropped significantly at concentrations higher than 2 M it was still detected at 3 M NaCl (Fig. S1). In contrast, ScHog1 reached its maximum at 0.5 M NaCl and then abruptly declined until being undetected at 2 M NaCl. A time-course assay was subsequently performed using the NaCl concentration at which the peak of phosphorylation was detected in the previous experiment. In this assay, the level of phosphorylated DhHog1 increased with time reaching its maximum at 60 min and then decreased gradually (Fig. 2b), but it was still detected after 180 min exposure to NaCl. In *S. cerevisiae*, the time-lapse of phospho-Hog1 under these conditions was much more transient than that observed in *D. hansenii*. Compared to ScHog1, the right shift of phosphorylated DhHog1 abundance in both the dose-dependent response and the time course indicates that DhHog1 is phosphorylated at higher NaCl concentrations than ScHog1 and for longer periods. This observation is in agreement with the salt tolerance level that *D. hansenii* showed in the cell growth assay and suggests that Hog1 can be required to some extent to induce resistance to high salt concentration.

### Construction of the DhHOG1 null mutant

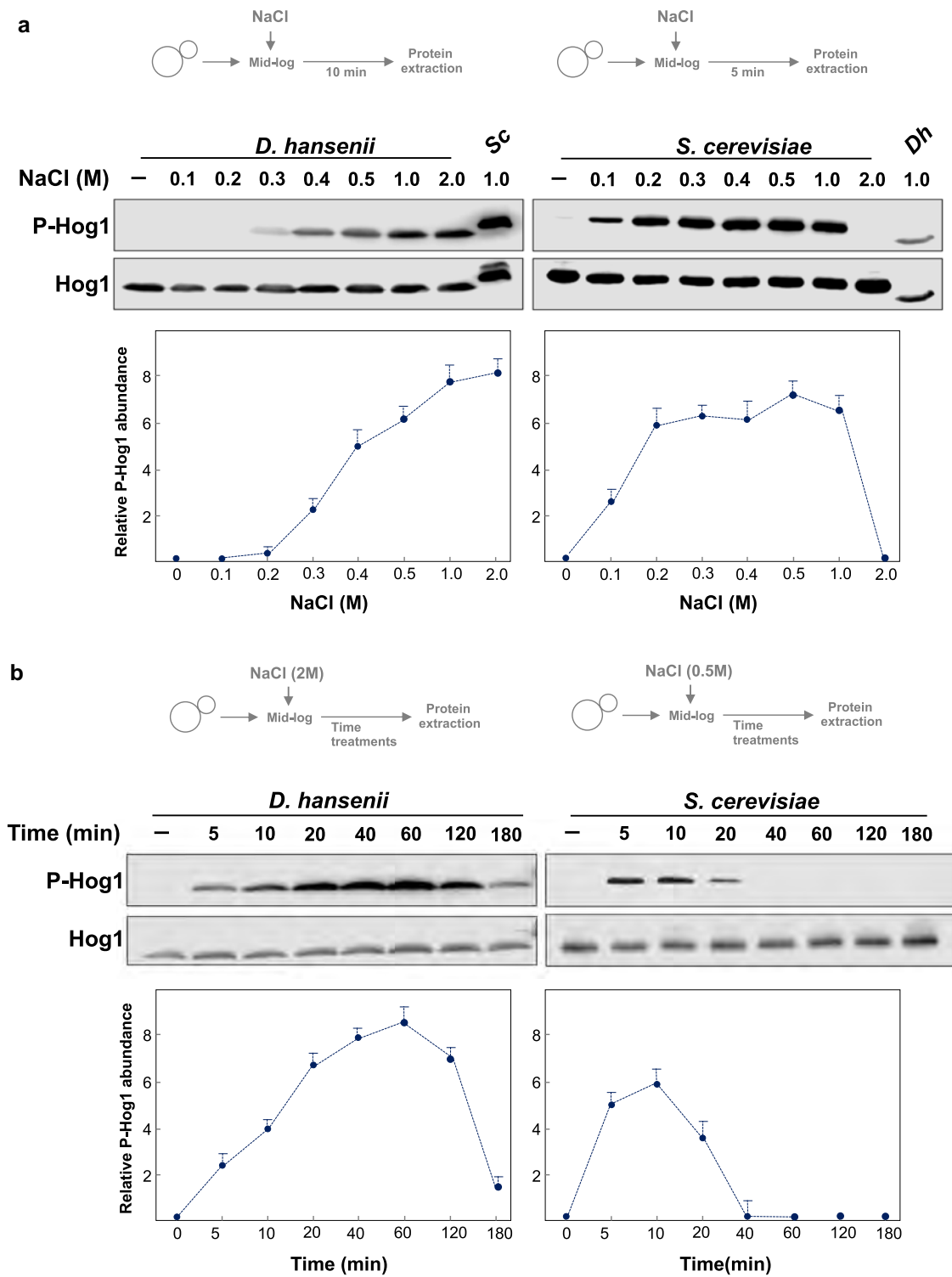
These previous observations suggest that the Hog1 MAPK may play an important role in the halotolerance mechanism in *D. hansenii*. The *DhHOG1* gene was cloned and sequenced (Bansal and Mondal 2000) and shown to encode a protein highly similar to Hog1 from a variety of species, including non-conventional yeast species (Fig. S2). The deduced DhHog1 protein is predicted to be 387 amino acid residues in length and shares 86% identity with ScHog1. It displays a conserved phosphorylatable TGY motif within the activation loop, and the two Pbs2 binding domains: the common docking (CD) domain and the PBD-2 domain (Murakami et al. 2008). The C-terminus of DhHog1 shows extensive differences in length and sequence compared to that of ScHog1; however, DhHog1 conserves the region that is involved in the regulation of ScHog1 autophosphorylation (Maayan et al. 2012). Interestingly, alignment shown in Fig. S2 indicates that species related to the CTG clade display globally a reduced Hog1 sequence in length concerning their C-terminus. This could reflect that, as previously observed in *Saccharomycotina* two-component systems (Hérviaux et al.

2018), some clade-specific evolution paths in stress response cell circuitries have likely intervened in budding yeasts.

To assess the contribution of DhHog1 to the halotolerance of *D. hansenii*, we designed a strategy for the construction of a *HOG1*-deleted strain. Conventional tools for gene replacement and inactivation are not useful in *D. hansenii*, since this yeast belongs to the CTG clade which ambiguously translates the CUG codon into Ser or Leu (Tekaiia et al. 2000). In this work the pAYCU244 plasmid (Fig. 3a) was used, which was previously optimised for genetic engineering the *D. hansenii* codon usage (Defosse et al. 2018). A cassette containing the *SAT1* gene (which confers nourseothricin resistance) and the *yeYFP* reporter gene (yeast-enhanced Yellow Fluorescent Protein) was used to replace the *DhHOG1* locus by homologous recombination (Fig. 3a). Only 9 clones (out of 624 nourseothricin-resistant clones) that were sensitive to 2 M NaCl were isolated. These 9 clones were subjected to a series of PCR reactions to explore the structure of their *HOG1* loci (Fig. 3b). Three clones appeared to have integrated the *SAT1-yeYFP* cassette in the right locus (Clones 2, 5 and 8), however, clones 5 and 8 presented also the wild type *HOG1* amplicon. Only in clone 2 was the *SAT1-yeYFP* cassette correctly integrated by a double-crossing over in the *HOG1* locus, suggesting that this was indeed a *bona fide* *HOG1* null mutant. This was further confirmed with two more observations: clone 2 showed a high expression of the *yeYFP* reporter (Fig. 3c) and it did not show cross reaction with the anti-Hog1 antibody nor with the anti-p38 antibody after treatment with 1 M NaCl (Fig. 3d). Taken together, the previous observations suggest that double-crossing over is not a frequent event in *D. hansenii* and that most integrations occur ectopically as previously observed in other unconventional yeast species (Schorsch et al. 2009; Kretzschmar et al. 2013; Oguro et al. 2017).

### DhHog1 is required for halotolerance in *D. hansenii*

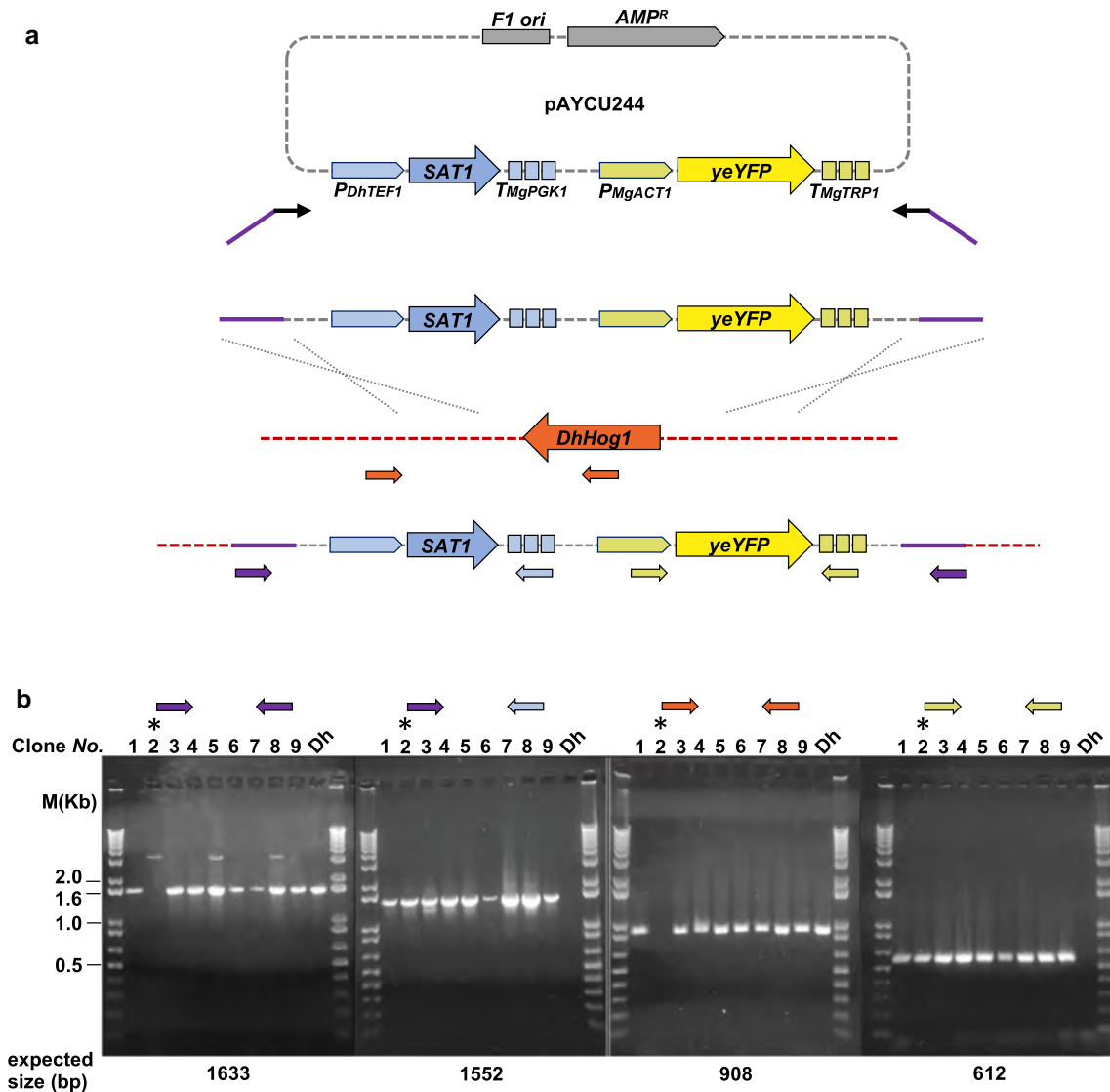
The participation and contribution of Hog1 in *D. hansenii* halotolerance were determined by spotting tenfold serial dilutions onto YPD plates containing increasing NaCl concentrations. In this assay, the wild-type (*WT*) *D. hansenii* strain grew adequately under all NaCl concentrations tested (Fig. 4) which is in agreement with the growth kinetics depicted in Fig. 1. Compared to the *Schog1Δ* mutant, which is highly sensitive to mid-NaCl concentrations, the growth of the *Dhhog1* mutant on 0.5 M NaCl was indistinguishable from that of the *WT* strain. However, inactivation of DhHog1 caused a strong reduction of growth at 1 M and higher NaCl concentrations. The effect of sorbitol, which imposes a different sort of osmotic stress than NaCl, was also tested. Growth of *WT* *D. hansenii* cells on sorbitol was similar to that on NaCl, however, the *Dhhog1Δ* mutant was very sensitive to high



**Fig. 2** Dose-dependent and time-course Hog1 phosphorylation in *D. hansenii* and *S. cerevisiae*. Cells were grown in YPD to mid-log phase and treated with NaCl. **a** Dose–response. Cells were treated with the indicated NaCl concentrations for 10 min (*D. hansenii*) or 5 min (*S. cerevisiae*). Protein extracts from the opposite strain treated with the indicated NaCl concentration (10 min for Sc and 5 min for Dh) were included in each blot. Extended NaCl dosage to 3 M is shown in Fig S1. **b** Time course. Cells were treated with 2 M (*D.*

*hansenii*) or 0.5 M (*S. cerevisiae*) NaCl for the indicated times. Relative phospho-Hog1 abundance was determined by densitometry of three independent blots. Values represent the quotient of phospho-Hog1 divided by total Hog1 and multiplied by 10. Bars represent the standard error. Total Hog1 was detected with anti-Hog1 antibody and phosphorylated Hog1 was detected in the same stripped membrane with an anti-phospho p38 antibody. Representative blot images are presented





**Fig. 3** **a** pAYCU244 plasmid map and DhHOG1 deletion strategy. Only relevant genes and regulatory sequences of pAYCU244 (Defosse et al. 2018) are depicted. The *SAT1* gene confers resistance to nourseothricin and the *yeYFP* gene encodes the yeast-enhanced yellow fluorescent protein. Primers to generate the *SAT1-yeYFP* cassette flanked by 40 bp recombinant tails (purple) are indicated with small black arrows. Cassette integration and *DhHOG1* gene replacement are indicated with tiny dotted grey lines. Small colored arrows indicate primers used to verify gene replacement. **b** PCR analysis of putative recombinant clones. Genomic DNA was used as a template. Coloured arrows (same code as **a**) on top of gels indicate the primers used in each reaction. Dh denotes PCR products from the WT strain. Expected PCR products size (bp) is indicated. Asterisk indicates clone with the right integration. **c** Microscopic images of *D.*

*hansenii* WT strain (control) and clone No. 2. Fresh cells grown in YPD or YPD + nourseothricin (clone No. 2) were observed by confocal microscopy in the double photon mode with an LSM 710-Zeiss microscope. *yeYFP* was observed at 514–527 nm, excitation and emission wavelengths respectively. Control images were visualised in brightfield mode. **d** Hog1 and phospho-Hog1 detection in putative recombinant clones by western-blotting. Cells grown to mid-log phase were incubated for 10 min in 1 M NaCl and protein extracts were prepared. Total Hog1 was detected with an anti-Hog1 antibody and phospho-Hog1 was detected in the same stripped membrane with an anti-p38 antibody. *D. hansenii* (Dh) and *S. cerevisiae* (Sc) protein extracts from cells treated in the same conditions were loaded in the same gel

sorbitol concentrations. Close examination of plates with osmo-equivalent concentrations of NaCl and sorbitol (e.g. 1.0 M NaCl vs 1.5 M sorbitol) (Almagro et al. 2000), show a more pronounced requirement of DhHog1 to deal with high sorbitol concentrations. These observations indicate

that DhHog1 is needed for optimal growth at high osmotic conditions, which is consistent with the observed phosphorylation peak which occurred at 2 M NaCl, and that it is required for halotolerance in *D. hansenii*.

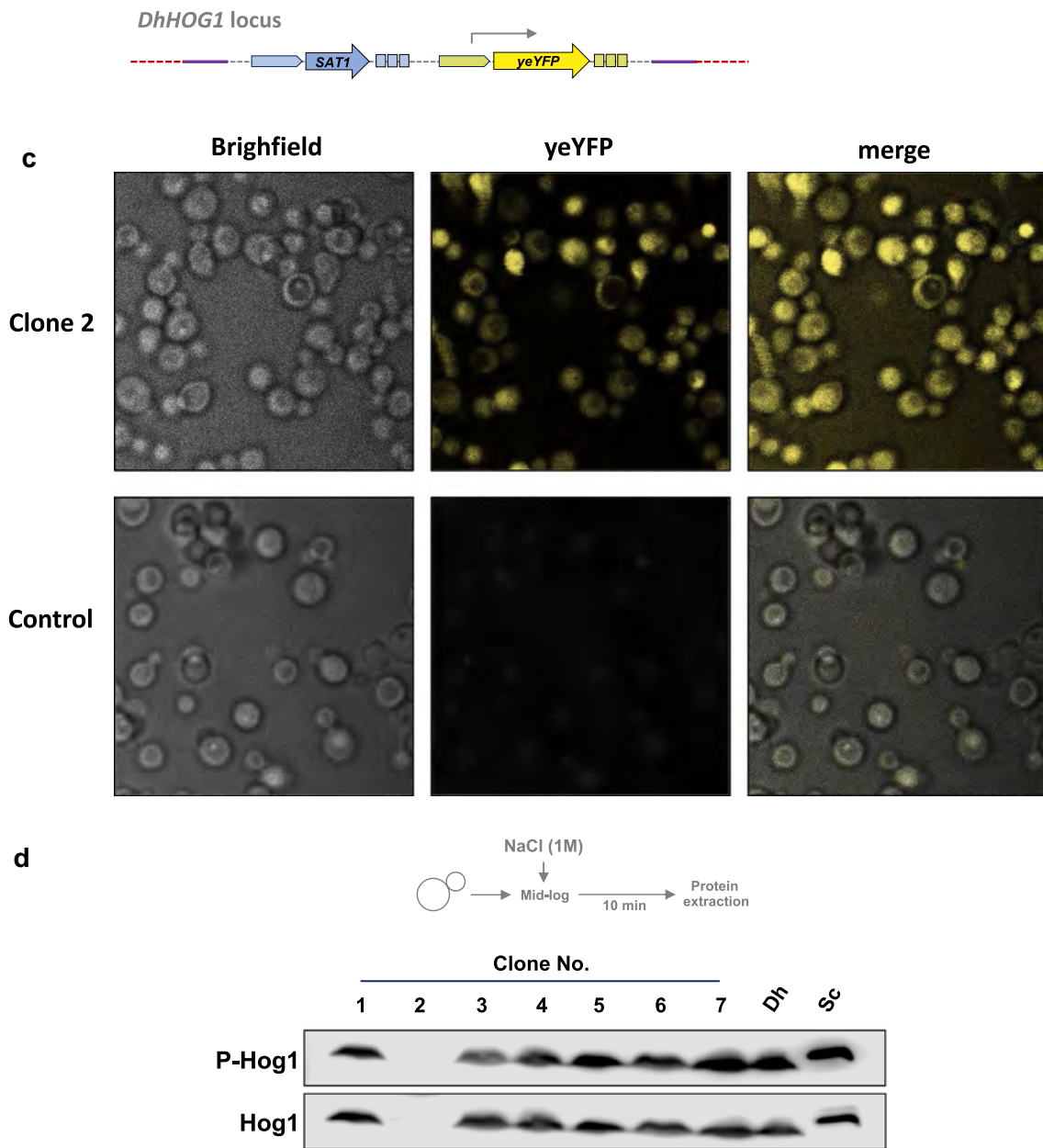
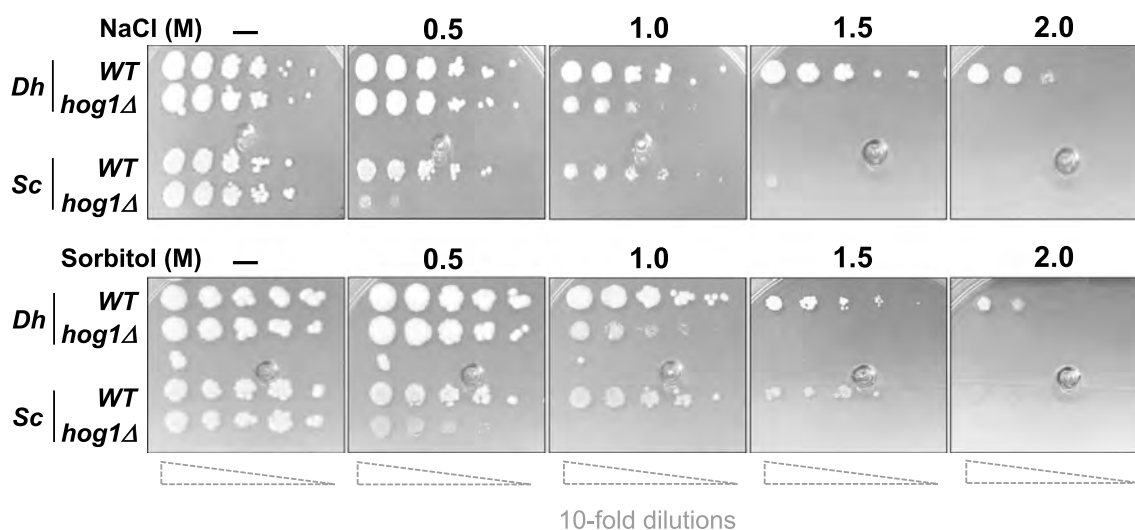


Fig. 3 (continued)

**DhHog1 is partially translocated to the nucleus after hyperosmotic treatment**

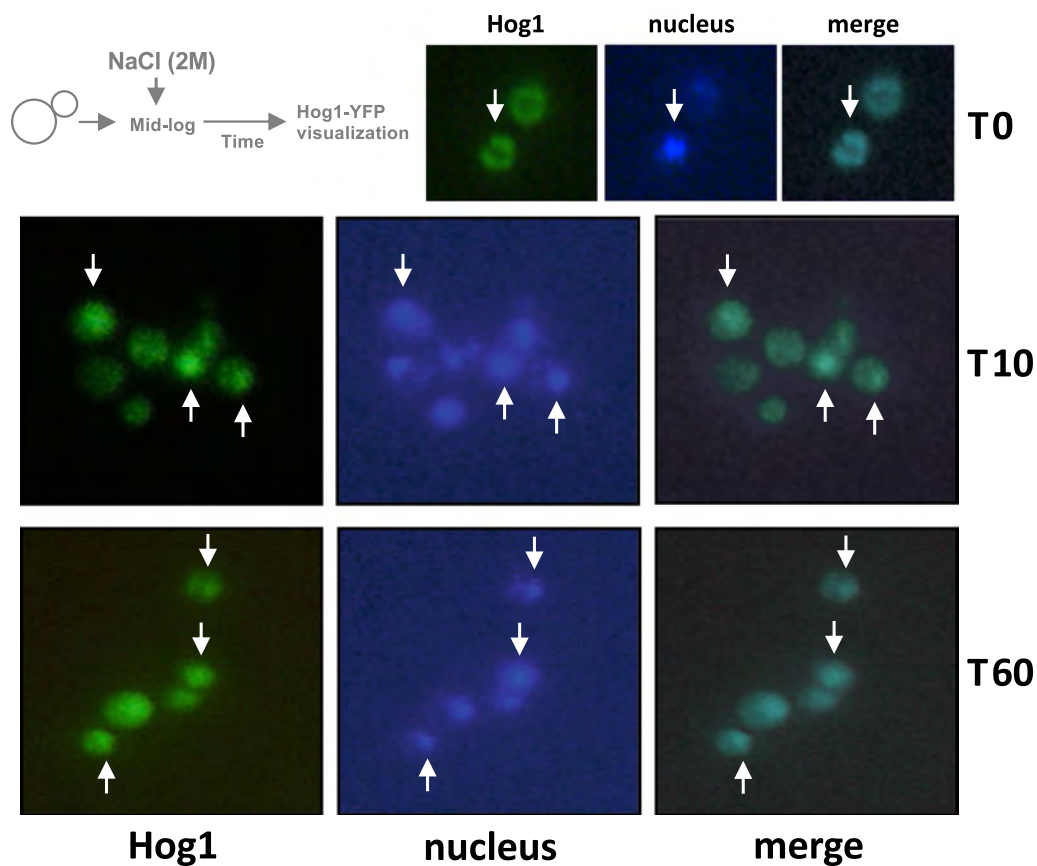
In *S. cerevisiae*, phosphorylation induces translocation of Hog1 from the cytoplasm to the nucleus, and this is achieved in *WT* cells after 5 min of exposure to hyperosmotic stress (Ferrigno et al. 1998). To determine whether DhHog1 would translocate into the nucleus after 2 M NaCl exposure, DhHog1 was tagged with the yeYFP protein. A similar strategy as for the construction of the *HOG1* null mutant was designed except that the *yeYFP* gene was

cloned in frame into the 3' end of *DhHOG1*. Integration of the *HOG1-yeYFP-SAT* cassette into the *DhHOG1* locus was also done by homologous recombination. With this strategy, it was detected that DhHog1 is in the cytoplasm under isosmotic conditions, but after different incubation times under hyperosmotic shock (2 M NaCl), a fraction of the yeYFP signal was detected also into the nucleus (Fig. 5). In our experiments we observed that DhHog1 was evenly distributed throughout the cytoplasm and nucleus from 10 to 180 min (Fig. S3) after the hyperosmotic



**Fig. 4** Effect of NaCl and Sorbitol dosage in cell growth. The indicated strains were grown to mid-log phase and adjusted to  $OD_{600}=1.0$ . Aliquots of tenfold serial dilution were spotted on YPD

or YPD containing the indicated NaCl or Sorbitol concentrations. Plates were incubated for 72 h at 28 °C and photographed. *DhHog1Δ* corresponds to clone 2 of Fig. 3



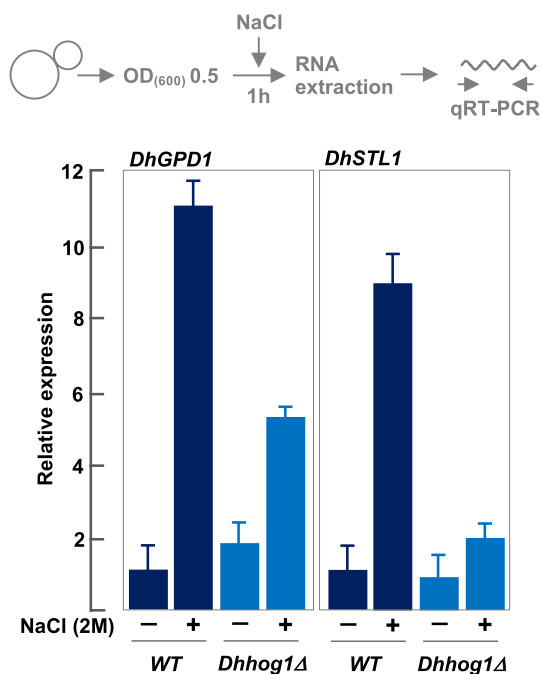
**Fig. 5** *DhHog1-yeYFP* localisation after hyperosmotic treatment. Cells carrying the integrated *DhHOG1-yeYFP* hybrid gene were grown to mid-log phase and treated with or without (T0) 2 M NaCl for 10 min (T10) or 60 min (T60). Representative images of cells

showing *DhHog1-yeYFP* and DAPI (nucleus) are shown. Images were acquired by epifluorescence microscopy. An extended time course (from 5 to 180 min) is shown in Fig S3

treatment, although by 180 min the amount of phospho-DhHog1 had decreased significantly (Fig. 2b).

### DhHog1 regulates transcription of DhGPD1 and DhSTL1 under hyperosmotic stress

Hyperosmotic stress induces changes in the transcription of several genes required for short- and long-term responses. To determine whether *D. hansenii* Hog1 has transcriptional activity on canonical osmo-regulated genes, expression of *DhGPD1* (encoding the NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase) and *DhSTL1* (encoding the glycerol-proton symporter of the plasma membrane) under hyperosmotic stress in both *WT* and *Dhhog1Δ* strains was measured. High osmotic shock led to a strong induction of transcription in the *WT* strain, in which both genes were upregulated about tenfold under 2 M NaCl (Fig. 6). In the *Dhhog1Δ* mutant, the expression of *DhGPD1* and *DhSTL1* dropped under osmotic stress twofold and fourfold respectively. Interestingly, while *DhSTL1* expression was fully dependent on DhHog1 under stress, around 50% of the *DhGPD1* expression did not depend on DhHog1 in high NaCl concentration.



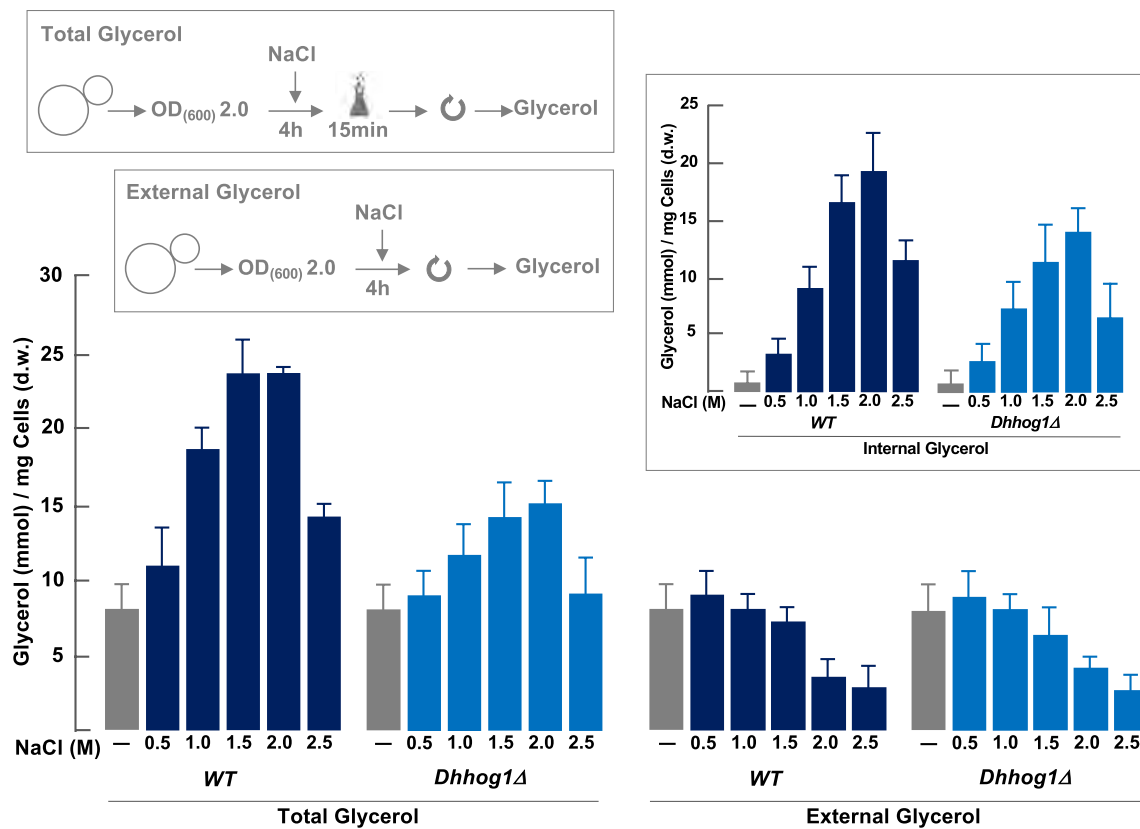
**Fig. 6** Effect of hyperosmotic stress and DhHog1 inactivation on gene expression. *WT* and *Dhhog1Δ* cells were grown in YPD to OD=0.5 and treated or not treated with 2 M NaCl for 1 h. Total RNA was obtained and subjected to qRT-PCR analysis. Relative transcript levels of *DhGPD1* or *DhSTL1* were obtained from the mean value of three independent experiments ( $\pm$ SD) normalised to the transcript levels of the *DhACT1* gene

### DhHog1 partially contributes to glycerol production upon hyperosmotic stress

In *S. cerevisiae*, Hog1 regulates glycerol concentration through two mechanisms: rapid accumulation due to direct modulation of metabolic enzymatic activity, and a long-term transcriptional induction of genes required for glycerol production and accumulation (Schaber et al. 2012). We studied the contribution of DhHog1 to long-term glycerol production and extracellular accumulation, which could explain the cellular adaptation to high salt environments. Cells were incubated with increasing NaCl concentrations and total and external glycerol were measured. The hyperosmotic treatment induced a gradual increase in total glycerol concentration, which reached its maximum at 1.5–2 M NaCl (Fig. 7). The amount of glycerol at these NaCl concentrations was about threefold higher compared to the untreated cells. At 2.5 M NaCl the amount of glycerol decreased, most probably due to pleiotropic defects in cell physiology and viability. The total glycerol accumulation in the *Dhhog1Δ* mutant followed similar kinetics compared to the *WT* strain, except that the maximum accumulation in 2 M NaCl was twofold higher than the condition with no stress and this value represents 60% of the maximum amount of glycerol accumulated in the *WT* strain (Fig. 7). The internal glycerol followed the same kinetics as the total glycerol in both, the *WT* strain and the *Dhhog1Δ* strain (Fig. 7, insert). These observations indicate that the contribution of DhHog1 to total glycerol accumulation is about 40% under hyperosmotic conditions. This result is in line with the previous observation through which it was detected that the expression of *DhGPD1* has a component that is independent of DhHog1 under hyperosmotic conditions. In contrast to total glycerol, the amount of external glycerol in the *WT* strain remained constant until 1.5 M NaCl, and then dropped moderately at 2.0 and at 2.5 M (Fig. 7). A similar kinetics for external glycerol under the NaCl dose curve was detected in the *Dhhog1Δ* mutant, indicating that DhHog1 does not contribute to the regulation of glycerol flux through the membrane under these conditions.

### Involvement of DhHog1 in the response to a variety of stressors

To date, it is clear that HOG pathways have pleiotropic roles in a variety of stressful conditions (Hernández-Elvira et al. 2019). Such is the case of the *Schizosaccharomyces pombe* Sty1 pathway, which is analogous to the *S. cerevisiae* HOG pathway. In *S. pombe*, Sty1 participates in a variety of stresses such as osmotic stress, heat shock, oxidative stress, UV light, nitrogen starvation and some other stress conditions (Hohmann 2002). To assess whether DhHog1 plays a role in stress conditions other



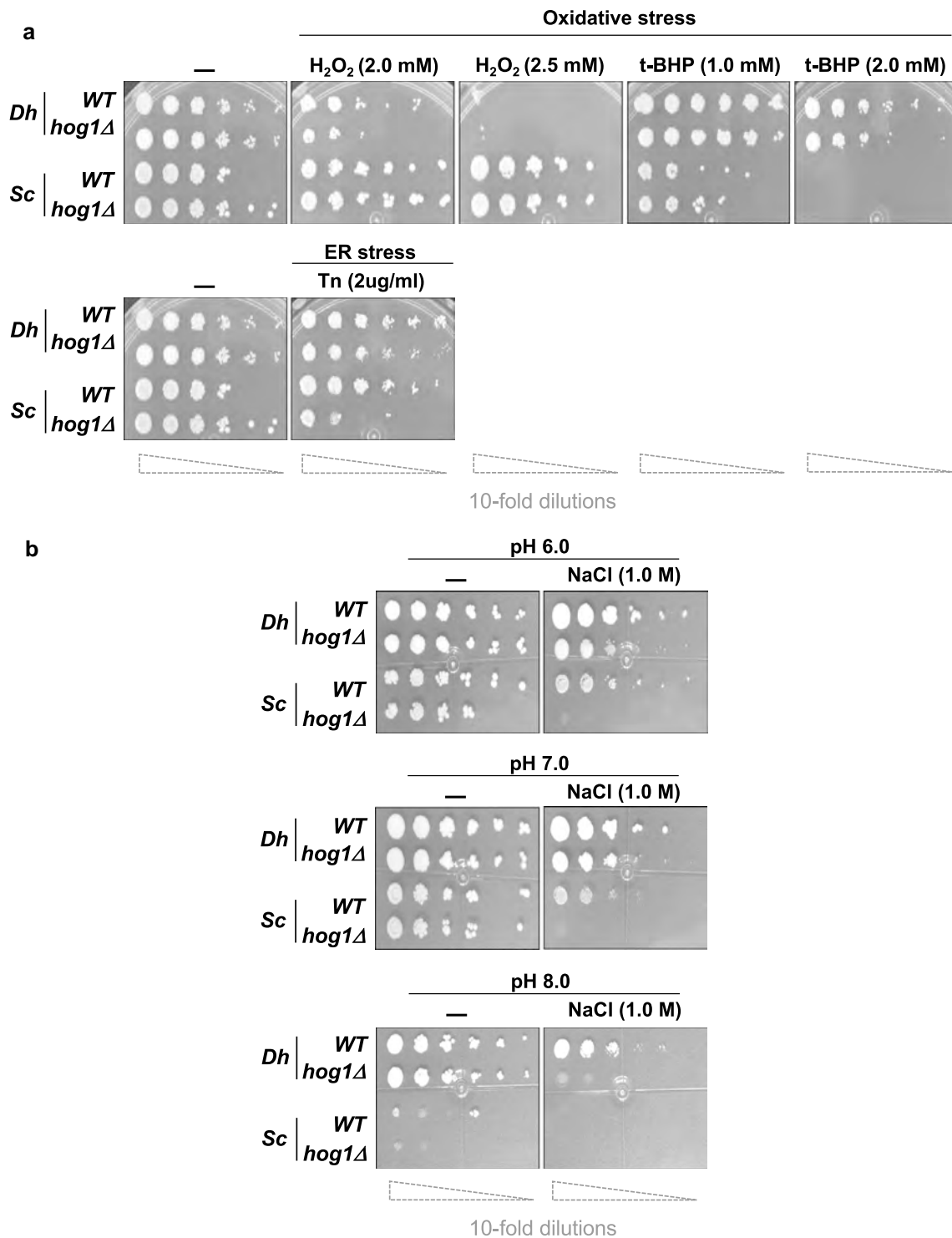
**Fig. 7** Effect of hyperosmotic stress and DhHog1 inactivation on glycerol accumulation. *WT* and *Dhhog1Δ* cells were grown in YPD to  $OD_{600}=2.0$  and treated or not treated with the indicated NaCl concentrations for 4 h. Cell suspension was divided into two samples; one was boiled for 15 min and used for total glycerol determination;

the second was centrifuged and the supernatant was used for external glycerol determination. Internal glycerol (insert) was calculated by means of the subtraction of external glycerol values from total glycerol values. Glycerol content is the mean value ( $\pm$ SD) of three independent experiments and referred to yeast dry weight

than hyperosmotic stress, we determined cell growth by spotting serial dilutions of cell suspension onto plates containing agents that induce oxidative stress, endoplasmic reticulum (ER) stress, and alkaline stress, and also under cold and heat stress. Under conditions of oxidative stress induced with either hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) or t-butyl-hydroperoxide (t-BHP) we were able to make two general observations: First, compared to *S. cerevisiae*, *D. hansenii* was highly sensitive to  $H_2O_2$ , but surprisingly resistant to stress induced with t-BHP (Fig. 8a). Secondly, the *Dhhog1Δ* mutant was moderately sensitive to oxidative stress induced with  $H_2O_2$  but not with t-BHP, while the *Schog1Δ* mutant was resistant to both agents (Fig. 8a). These observations suggest that DhHog1 may participate in the response to oxidative stress which is in agreement with the DhHog1 phosphorylation induced with  $H_2O_2$  (Sharma et al. 2005). Under ER stress conditions induced with the antibiotic tunicamycin (Tn) (Torres-Quiroz et al. 2010), it was found that the *Dhhog1Δ* mutant was moderately sensitive to Tn, at a concentration where the *Schog1Δ* mutant shows severe growth impairment (Fig. 8a).

Regarding the stress imposed by pH, the alkali-tolerant nature of *D. hansenii* is known. It can grow reasonably well at a pH of 8.0, a condition where *S. cerevisiae* is highly sensitive (Fig. 8b; Sánchez et al. 2018). Accordingly, the ability of the *Dhhog1Δ* mutant to grow on plates buffered at pH 8.0 compared with neutral and acidic pH (7.0 and 6.0 respectively) was tested. First, as expected, it was found that the *WT* strain of *D. hansenii* grew adequately in the three conditions, while the growth of *S. cerevisiae* at pH 8.0 was impaired (Fig. 8b). Interestingly, the *Dhhog1Δ* mutant showed an unexpected high sensitivity to pH 8.0 when combined with 1 M NaCl, which is a mid-stress condition for *D. hansenii* (Fig. 8b). The effect of hyperosmotic stress on the *Dhhog1Δ* mutant was not observed at pH 6.0 and 7.0. This indicates that under high salt concentrations, Hog1 is required to cope with alkali stress in *D. hansenii*.

Finally, it was explored whether DhHog1 is involved in response to cold stress and heat stress. *D. hansenii* Hog1 has no apparent role in this sort of stress (Fig. S4). However, it was detected that *D. hansenii* is cold-resistant, based on its ability to grow at 16 °C in short periods and at 4 °C in long



**Fig. 8 a** Effect of oxidative and ER stress on cell growth. The indicated strains were grown to mid-log phase and adjusted to OD<sub>600</sub>=1.0. Aliquots of tenfold serial dilution were spotted on YPD or YPD containing the indicated concentrations of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), t-butyl-hydroperoxide (t-BHP) or tunicamycin (Tn). Plates were incubated for 72 h at 28 °C and photographed. Oxidative and ER stress assays were performed with the same cultures at the same

time, so the control plate has been duplicated for better comparison. **b** Effect of alkali and hyperosmotic stress in cell growth. The indicated strains were grown and plated as indicated in **a**. The pH of YPD medium was adjusted to the indicated values prior to sterilisation. 50 mM MES-TEA, 50 mM HEPES-TEA or 50 mM TAPS-TEA were used to buffer at pH 6.0, 7.0 and 8.0, respectively. Plates were incubated for 72 h at 28 °C and photographed

periods (which is not observed in *S. cerevisiae*) and that it is sensitive to heat stress, due to its inability to grow at 33 °C or higher temperatures, at which *S. cerevisiae* still grows adequately.

## Discussion

*D. hansenii* is one of the most halotolerant and osmotolerant yeasts, which under some conditions, it can grow even in concentrations as high as 4.0 M NaCl (Onishi 1963; Norkrans 1966). Given this characteristic, *D. hansenii* has high biotechnological potential in the food industry, which makes it of high interest to understand the molecular mechanisms that contribute to its halotolerant behaviour. Although some studies have addressed the participation of the HOG pathway in the response to hyperosmotic stress (Sharma and Mondal 2005; Sharma et al. 2005), some conclusions have been obtained by inter-species gene expression. Here we report for the first time the phenotypic characterization of a null *HOG1* mutant in *D. hansenii* that allowed us to unequivocally determine the contribution of this MAPK to the halotolerance of this yeast. We have also given an accurate description of the activation kinetics of DhHog1, its transcriptional activity in canonical osmo-responsive genes, its participation in long-term glycerol production, and its involvement under different stress conditions.

Our observations indicate that *WT D. hansenii* can grow in NaCl concentrations  $\geq 2$  M, which is consistent with the previous classification of this species as a yeast belonging to the 3 M salt-stress class (Lages et al. 1999), and that deletion of *DhHOG1* induces sensitivity to that range of concentrations. Although at a slower rate than the *WT* strain, a mutant devoid of DhHog1 was still able to grow in 1 M NaCl, a concentration that imposes a strong negative effect on *S. cerevisiae* as detected in this and other works (Blomberg 1997; Rodríguez-González et al. 2017).

Our data indicate that strong Hog1 phosphorylation depends on high external osmolarity and that in low osmolarity, where ScHog1 is phosphorylated at a high level, DhHog1 is not activated. Accordingly, high expression of *DhSTL1* and *DhGPD1* was detected at 2 M NaCl and the long-term glycerol production peaked at this concentration. These observations indicate that the *D. hansenii* HOG pathway is set to be activated with high external osmolarity and that in low and mid-osmotic conditions, other protection systems should be active. A similar situation is present in the extreme halotolerant yeast *Hortaea werneckii*, where its two redundant paralogous Hog1A and Hog1B are fully active at salinities  $\geq 3$  M, but not at moderate NaCl concentrations (Kejžar et al. 2015). The fact that the HOG pathway can be activated at high NaCl concentrations is supported by the ability of *D. hansenii* to accumulate a large amount of Na<sup>+</sup>

inside the cell, which is a trait that prompted some authors to describe it as a 'sodium includer' (Norkrans and Kylin 1969; Prista et al. 1997; Prista and Loureiro-Dias 2007).

In *S. cerevisiae*, phosphorylation is necessary to allow translocation of Hog1 from the cytoplasm to the nucleus, and this is achieved in wild-type cells after 5 min of exposure to hyperosmotic stress (Ferrigno et al. 1998). Nuclear localisation under this condition is transient and retro-translocation to cytoplasm occurs through the action of protein phosphatases, including nuclear Tyr-phosphatase Ptp2 (Mattison and Ota 2000). Thus, translocation to the nucleus of DhHog1 was detected within 10 min after hyperosmotic stress was imposed with 2 M NaCl and it was still detected inside the nucleus after 180 min of treatment. This behaviour is consistent with the phosphorylation time course obtained with 2 M NaCl. Interestingly, DhHog1 was also detected in the cytoplasm throughout the entire time course. These observations show some differences with previous studies in which DhHog1 was visualised by indirect immunostaining (Sharma et al. 2005). In those experiments, the nuclear accumulation of DhHog1 was delayed 90 min after hyperosmotic shock, and then re-entry into the cytoplasm occurred 150 min later. The discrepancy with our observations could be explained by differences in the detection level between indirect immunofluorescence and detection of the hybrid DhHog1-yeYFP, and/or differences in strain's genetic backgrounds. Although we do not know whether cytoplasmic DhHog1 is active in our conditions, its long nuclear retention not only matches with its phosphorylation status but also its role under extreme hyperosmotic conditions in which sustained long activity is expected. Although a decline in phosphorylation occurred in long periods, DhHog1 was still present in the nucleus. Disregarding an effect of increased protein turnover, this observation suggests that a mechanism of downregulation, mediated perhaps by nuclear phosphatases (Mattison and Ota 2000) may be present in *D. hansenii*. Interestingly a study of comparative genomics of the HOG signalling system predicts lack of Ptp2 phosphatase in *D. hansenii* (Krantz et al. 2006), suggesting that Ptp3 (which is present) may take both roles.

The peak in glycerol accumulation at 2 M NaCl correlates very well with the high expression of *DhGPD1* and *DhSTL1* detected at this concentration. While expression of *DhSTL1* was fully dependent on DhHog1, the DhHog1-dependent expression of *DhGPD1* was 60%. The high expression of *DhSTL1* is strongly correlated with the high glycerol/H<sup>+</sup> symporter activity that has been determined in *D. hansenii* (Pereira et al. 2014). The expression of both *DhGPD1* and *DhSTL1* in *D. hansenii*, followed a pattern of behaviour similar to that found in *S. cerevisiae*. *STL1* is an osmo-responsive gene whose expression completely depends on Hog1 (O'Rourke and Herskowitz 2004), while *GPD1* not only depends on Hog1 under hyperosmotic stress but also

on other signalling systems (Rep et al. 1999). It is worth considering that under hyperosmotic stress, *GPD1* can also be transcriptionally regulated by a Cyc8/Tup1-SUMOylation-dependent des-repression mechanism (Nadel et al. 2019), thus several mechanisms can be acting in concert to achieve a tight control of *DhGPD1* expression. Our observations indicate that a significant expression of *DhGPD1* was induced by osmotic stress in the *Dhhog1Δ* mutant, suggesting that other pathways may be participating or that a fraction of *DhGPD1* expression is controlled by a general stress mechanism in *D. hansenii*. It would be interesting to determine whether the stress caused specifically by Na<sup>+</sup> ions in *D. hansenii* can activate the Ca<sup>++</sup>-Calcineurin pathway and to what extent this may regulate the response to hyperosmotic stress.

In *S. cerevisiae*, Hog1 regulates glycerol concentration through two distinct mechanisms. One is a rapid accumulation of glycerol which includes the closure of the Fps1 glycerol channel to diminish glycerol efflux (Lee et al. 2013) and the increase of glycerol synthesis by upregulation of both *GPD1* (Westfall et al. 2008), and *PFK2* (which encodes 6-phosphofructo-2-kinase) (Dihazi et al. 2004). The second is the transcriptional regulation of a large set of genes required for glycerol synthesis and accumulation (O'Rourke and Herskowitz 2004). Here we found that DhHog1 contributes to long term responses. Indeed, the amount of accumulated glycerol gradually increased with the increase in osmolarity until reaching a plateau at 1.5–2 M NaCl, in both, total and internal glycerol. This long-term glycerol production was just partially dependent on Hog1 since the maximum accumulation dropped just 1.5 fold in the *Dhhog1Δ*. The DhHog1-independent glycerol accumulation has not only the transcriptional component as discussed above, but also the increase in enzymatic activity directly exerted by NaCl (Adler et al. 1985; André et al. 1991). In fact, glycerol production can be enhanced by increased activity of Gpd1 and dihydroxyacetone kinase (Dak1,2) promoted by NaCl, which appears to modulate the specific activity of these enzymes. Interestingly, *D. hansenii* Gpd1 displays 10-folds more specific activity in the presence of NaCl than that of *S. cerevisiae* (Adler et al. 1985; André et al. 1991; Thomé 2005). Although the role of glycerol as a suitable compatible osmolyte in *D. hansenii* has been determined (Adler and Gustafsson 1980; Lages et al. 1999; Gori et al. 2005), it is important to consider that other polyols like arabinitol and trehalose may also contribute to the osmo-protection through a combined interplay (Adler and Gustafsson 1980; González-Hernández et al. 2005). The increase in total and internal glycerol accumulation and the contribution of Hog1 in *D. hansenii* coincide with those of *Kluyveromyces lactis*, where glycerol increases fivefold under hyperosmotic stress and KIHog1 contributes 50% to this increase (Rodríguez-González et al. 2017). Given the halo-sensitive nature of *K.*

*lactis*, the common feature between both species is that they share highly respiratory metabolisms.

Regarding the amount of external glycerol under increasing NaCl concentrations, we found that this did not follow the same kinetics as total and internal glycerol. In fact, although no significant differences were detected, external glycerol showed a tendency to diminish as the concentration of NaCl rose. One likely explanation was that this was due to increased glycerol uptake mediated by high Stt1 symporter activity. We have disregarded this possibility since the profile of the mutant strain, where expression of *DhSTL1* is negligible, mirrored that of the wild type strain. However, it is important to mention that *D. hansenii* can accumulate glycerol against a strong concentration gradient (Alder et al. 1985). Whether this is due only to the DhStt1 activity and/or to other transport systems remains to be determined. Another possibility could be that glycerol efflux is a low capacity process in *D. hansenii*, due to the lack of a canonical aquaglyceroporin (Fps1 in *S. cerevisiae*) capable of releasing glycerol under hyperosmotic stress (Pettersson et al. 2005; Sabir et al. 2016). It is worth noting, however, that *D. hansenii* contains a gene that is orthologous to the *S. cerevisiae* aquaporins Aqy1 and Aqy2, which are orthodox water channels that apparently may transport not only water but also solutes (Pettersson et al. 2005). Orthodox aquaporins have been poorly studied in yeast species. In *S. cerevisiae*, functional expression of aquaporins is strongly dependent on the strain. When expressed, aquaporins appear to play a role in freeze tolerance, but Aqy1 seems to be specific for sporulation, while Aqy2 is expressed in vegetative cells but is downregulated by hyperosmotic stress in a Hog1-dependent manner (Ahmadpour et al. 2014). The genome of *D. hansenii* appears to encode only one aquaporin (which is slightly more related to ScAqy2) (Sabir et al. 2016). Whether this putative DhAqy2 participates in the regulation of glycerol efflux under hyperosmotic stress in *D. hansenii*, it is necessary to speculate that its regulation should largely differ from that of *S. cerevisiae*. It would be interesting to determine whether DhAqy2 has a role in the cold tolerance of *D. hansenii* detected in this work. Finally, the total and external glycerol reduction observed in concentrations over 2 M NaCl, which coincide with the drop in DhHog1 phosphorylation, cannot be explained as a regulatory mechanism exerted by DhHog1, but rather by an altered metabolic condition promoted by the hyperosmotic stress.

In addition to its participation in the hyperosmotic stress response, ScHog1 has been shown to have pleiotropic activities in a variety of conditions; for example, it has a role in the endoplasmic reticulum (ER) stress response (Torres-Quiroz et al. 2010; Hernández-Elvira et al. 2019), in the general stress response (de Nadal and Posas 2010) and even in mitophagy (Mao and Klionsky 2011). According to the results reported in this work, DhHog1 also appears



to play a role in response to oxidative stress, which is in agreement with the transcriptional induction, triggered by NaCl, of genes for oxidative protection (Segal-Kischinevsky et al. 2011; Calderón-Torres et al. 2011; Michán et al. 2013; Ramos-Moreno et al. 2019); DhHog1 may also play a role in the response to ER stress induced by tunicamycin, which inhibits protein N-glycosylation. Since this is extranuclear Hog1 activity (Torres-Quiroz et al. 2010; Hernández-Elvira et al. 2019), it was not surprising to detect DhHog1 in the cytoplasm during hyperosmotic stress. Our results also suggest that DhHog1 does not participate in cold stress nor in heat stress. Although we performed a wide screening at a variety of temperatures, we do not discard DhHog1 cross-activation by simultaneous induction of temperature stress and hyperosmotic or oxidative stress.

An interesting finding in this work was the strong sensitivity displayed by the *Dhhog1Δ* mutant to combined hyperosmotic stress and alkali stress. The resistance of *D. hansenii* to alkaline conditions is a property well known since the first isolated strains came from the ocean (pH around 8.0) (Norkrans 1966, 1968), and another strain has been isolated from soy sauce with a pH around 10 (Kurita and Yamazaki 2002). In natural environments, where a myriad of stressful conditions are simultaneously present, the finding that Hog1 is essential to cope with alkali stress in a mid-osmotic condition is quite relevant to the understanding of the physiological characteristics of an alkali-halotolerant yeast. In fact, it has been demonstrated that *D. hansenii* has a high capacity to acidify a medium buffered at pH 8.0 in the presence of high salt concentration (Sánchez et al. 2018). Additionally, *D. hansenii* expresses an alkali-metal-cation/H<sup>+</sup> antiporter of broad spectrum (Velkova and Sychrova 2006; Ramos et al. 2011) and two Na<sup>+</sup>-ATPases which are overexpressed in high NaCl concentrations and one of them also in high pH (Almagro et al. 2001). It now, appears that this alkali-resistance is at least in part regulated by the Hog1 MAPK in *D. hansenii*.

Our study points to the scenario where the HOG pathway of *D. hansenii* is activated with high external osmolarity, and that under low and mid-osmotic conditions other protection systems are active. Several studies have identified factors that may play a role in the halotolerance of this yeast, including the increase of ergosterol in the plasma membrane in high salt concentrations (Turk et al. 2007) and the induction of expression and activity of several transporters such as the K<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> symporter (Martínez et al. 2011). Thus, several osmoregulatory mechanisms must act in a coordinated fashion to permit an adaptive cellular response to salty environments.

Here we described for the first time the construction of a *HOG1* null mutant by homologous recombination in *D. hansenii*, a technical approach that has been elusive for some time, and most importantly we have determined the

threshold of salt concentration that *D. hansenii* may tolerate without Hog1 and the contribution that this MAPK plays in the halotolerance of this species.

**Acknowledgements** NSS is very grateful to Dr Juan Pablo Pardo, of the UNAM school of Medicine, for fruitful discussions throughout the project. The authors wish to thank Dr Yazmín Ramiro for her help with the Two-Photon Confocal Microscopy. We are also grateful to Dr Laura Ongay, MSc Minerva Mora and Biol Guadalupe Códiz from the Molecular Biology Unit. We would like to recognise Dr Laura Kawasaki and Francisco Padilla for their technical assistance. Dr Mariana Hernández-Elvira helped NSS with some methodology. We are also grateful to Gerardo Coello, Ana María Escalante, Juan Barbosa and Ivette Rosas from the Computing Unit and Manuel Ortínez and Aurey Galván from the maintenance workshop. NSS is a PhD student in the Doctorate Program in Biochemical Science, UNAM. This work was supported by CONACyT (Grant No. CB-238497 to AP) and PAPIIT, DGAPA, UNAM (Grants IN223399 and IN202103 to AP and IN210519 to RC). We also extend our thanks to Patrick Weill for revising the English grammar of the text.

## References

- Adler L, Gustafsson L (1980) Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. Arch Microbiol 124:123–130. <https://doi.org/10.1007/BF00427716>
- Adler L, Blomberg A, Nilsson A (1985) Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. J Bacteriol 162:300–306
- Ahmadpour D, Geijer C, Tamás MJ, Lindkvist-Petersson K, Hohmann S (2014) Yeast reveals unexpected roles and regulatory features of aquaporins and aquaglyceroporins. Biochim Biophys Acta 1840:1482–1491. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.027>
- Alba-Lois L, Segal C, Rodarte B, Valdés-López V, DeLuna A, Cárdenas R (2004) NADP-glutamate dehydrogenase activity is increased under hyperosmotic conditions in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. Curr Microbiol 48:68–72. <https://doi.org/10.1007/s00284-003-4076-7>
- Almagro A, Prista C, Castro S, Quintas C, Madeira-Lopes A, Ramos J, Loureiro-Dias MC (2000) Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. Int J Food Microbiol 56:191–197. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00220-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00220-8)
- Almagro A, Prista C, Benito B, Loureiro-Dias MC, Ramos J (2001) Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces Hansenii*. J Bacteriol 183:3251–3255. <https://doi.org/10.1128/jb.183.10.3251-3255.2001>
- André L, Nilsson A, Adler L (1988) The role of glycerol in osmotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. Microbiology 134:669–677. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-3-669>
- André L, Hemming A, Adler L (1991) Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>). FEBS Lett 286:13–17. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80930-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80930-2)
- Ariño J, Ramos J, Sychrova H (2019) Monovalent cation transporters at the plasma membrane in yeasts. Yeast 36:177–193. <https://doi.org/10.1002/yea.3355>
- Bansal PK, Mondal AK (2000) Isolation and sequence of the HOG1 homologue from *Debaryomyces hansenii* by complementation of the *hog1Δ* strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast

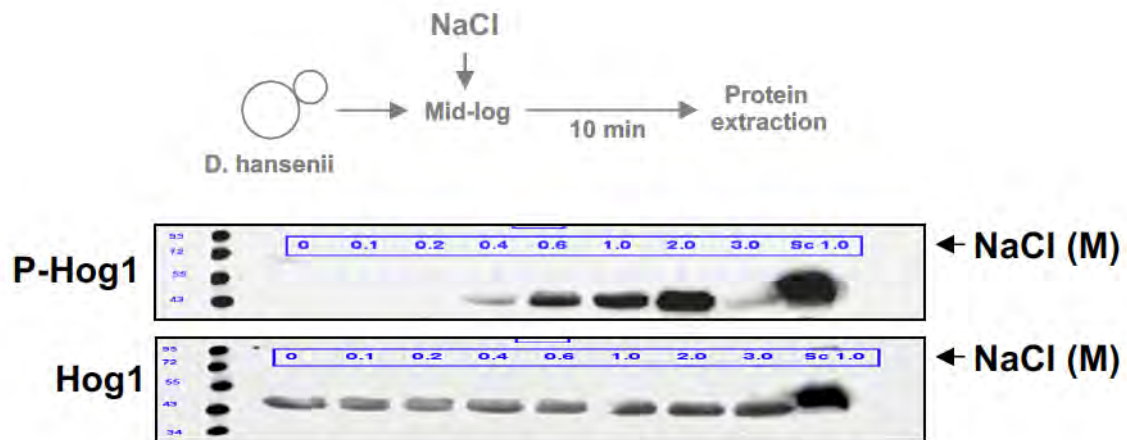
- 16:81–88. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(2000115\)16:1<81::AID-YEA510>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(2000115)16:1<81::AID-YEA510>3.0.CO;2-I)
- Blomberg A (1997) The osmotic hypersensitivity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is strain and growth media dependent: Quantitative aspects of the phenomenon. *Yeast* 13:529–539. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199705\)13:6<529::AID-YEA103%3E3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199705)13:6<529::AID-YEA103%3E3.0.CO;2-H)
- Blomberg A, Adler L (1992) Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv Microb Physiol* 33:145–212. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60217-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60217-9)
- Cabrera-Orefice A, Chiquete-Félix N, Espinasa-Jaramillo J, Rosas-Lemus M, Guerrero-Castillo S, Peña A, Uribe-Carbajal S (2014a) The branched mitochondrial respiratory chain from *Debaryomyces hansenii*: Components and supramolecular organization. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1837:73–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.07.011>
- Cabrera-Orefice A, Guerrero-Castillo S, Díaz-Ruíz R, Uribe-Carvajal S (2014b) Oxidative phosphorylation in *Debaryomyces hansenii*: Physiological uncoupling at different growth phases. *Biochimie* 102:124–136. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.03.003>
- Calahorra M, Sánchez NS, Peña A (2009) Activation of fermentation by salts in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* 9:1293–1301. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00556.x>
- Calderón-Torres M, Castro DE, Montero P, Peña A (2011) DhARO4 induction and tyrosine nitration in response to reactive radicals generated by salt stress in *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* 28:733–746. <https://doi.org/10.1002/yea.1903>
- Chawla S, Kundu D, Randhawa A, Mondal AK (2017) The serine/threonine phosphatase DhSIT4 modulates cell cycle, salt tolerance and cell wall integrity in halo tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Gene* 606:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.12.022>
- de Nadal E, Posas F (2010) Multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases. *EMBO J* 29:4–13. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.346>
- de Nadal E, Alepuz PM, Posas F (2002) Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation. *EMBO Rep* 3:735–740. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf158>
- Defosse TA, Courdavault V, Coste AT, Clastre M, Dugé de Bernonville T, Godon C, Vandeputte P, Lanoue A, Touzé A, Linder T, Droby S, Rosa CA, Sanglard D, d'Enfert C, Bouchara JP, Giglioli-Guivarc'h N, Papon N (2018) A standardized toolkit for genetic engineering of CTG clade yeasts. *J Microbiol Methods* 144:152–156. <https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2017.11.015>
- Dihazi H, Kessler R, Eschrich K (2004) High osmolarity glycerol (HOG) pathway-induced phosphorylation and activation of 6-phosphofructo-2-kinase are essential for glycerol accumulation and yeast cell proliferation under hyperosmotic stress. *J Biol Chem* 279:23961–23968. <https://www.jbc.org/content/279/23/23961>
- Ferrigno P, Posas F, Koepf D, Saito H, Silver PA (1998) Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin b homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J* 17:5606–5614. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5606>
- Fitzpatrick DA, Logue ME, Stajich JE, Butler G (2006) A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol Biol* 6:99. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-99>
- Gerami-Nejad M, Dulmage K, Berman J (2009) Additional cassettes for epitope and fluorescent fusion proteins in *Candida albicans*. *Yeast* 26:399–406. <https://doi.org/10.1002/yea.1674>
- Gezelius K, Norkrans B (1970) Ultrastructure of *Debaryomyces hansenii*. *Archiv Mikrobiol* 70:14–25. <https://doi.org/10.1007/BF00691057>
- González-Hernández JC, Jiménez-Estrada M, Peña A (2005) Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress. *Extremophiles* 9:7–16. <https://doi.org/10.1007/s00792-004-0415-2>
- Gori K, Mortensen HD, Arneborg N, Jespersen L (2005) Expression of the *GPD1* and *GPP2* orthologues and glycerol retention during growth of *Debaryomyces hansenii* at high NaCl concentrations. *Yeast* 22:1213–1222. <https://doi.org/10.1002/yea.1306>
- Gori K, Sørensen LM, Petersen MA, Jespersen L, Arneborg N (2012) *Debaryomyces hansenii* strains differ in their production of flavor compounds in a cheese-surface model. *Microbiologopen* 1:161–168. <https://doi.org/10.1002/mbo3.11>
- Guerrero CA, Aranda C, DeLuna A, Filetici P, Riego L, Anaya VH, González A (2005) Salt-dependent expression of ammonium assimilation genes in the halotolerant yeast, *Debaryomyces hansenii*. *Curr Genet* 47:163–171. <https://doi.org/10.1007/s00294-004-0560-2>
- Gustafsson L, Norkrans B (1976) On the mechanism of salt tolerance. *Arch Microbiol* 110:177–183. <https://doi.org/10.1007/BF00690226>
- Hérivaux A, Lavín JL, de Bernonville TD, Vandeputte P, Bouchara JP, Gastebois A, Oguiza JA, Papon N (2018) Progressive loss of hybrid histidine kinase genes during the evolution of budding yeasts (*Saccharomycotina*). *Curr Genet* 64:841–851. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0797-1>
- Hernández-Elvira M, Martínez-Gómez R, Domínguez-Martin E, Méndez A, Kawasaki L, Ongay-Larios L, Coria R (2019) Tunicamycin sensitivity-suppression by high gene dosage reveals new functions of the yeast Hog1 MAP kinase. *Cells* 8:710. <https://doi.org/10.3390/cells8070710>
- Hohmann S (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:300–372. <https://doi.org/10.1128/mmr.66.2.300-372.2002>
- Hohmann S (2015) An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Curr Genet* 61:373–382. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0475-0>
- Kejžar A, Gröthli M, Tamás MJ, Plemenitaš A, Lenassi M (2015) HwHog1 kinase activity is crucial for survival of *Hortaea werneckii* in extremely hyperosmolar environments. *Fungal Genet Biol* 74:45–58. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.11.004>
- Klein M, Swinnen S, Thevelein JM, Nevoigt E (2017) Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. *Environ Microbiol* 19:878–893. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13617>
- Krantz M, Becit E, Hohmann S (2006) Comparative genomics of the HOG-signalling system in fungi. *Curr Genet* 49:137–157. <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0038-x>
- Kretzschmar A, Otto C, Holz M, Werner S, Hübner L, Barth G (2013) Increased homologous integration frequency in *Yarrowia lipolytica* strains defective in non-homologous end-joining. *Curr Genet* 59:63–72. <https://doi.org/10.1007/s00294-013-0389-7>
- Kurita O, Yamazaki E (2002) Growth under alkaline conditions of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* IFO10939. *Curr Microbiol* 45:277–280. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3735-4>
- Lages F, Silva-Graça M, Lucas C (1999) Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Microbiology* 145:2577–2585. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-9-2577>
- Larsson C, Morales C, Gustafsson L, Adler L (1990) Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *J Bacteriol* 172:1769–1774. <https://doi.org/10.1128/jb.172.4.1769-1774.1990>
- Lee J, Reiter W, Dohnal I, Gregori C, Beese-Sims S, Kuchler K, Ammerer G, Levin DE (2013) MAPK Hog1 closes the *S. cerevisiae* glycerol channel Fps1 by phosphorylating and displacing its positive regulators. *Genes Dev* 27:2590–2601. <https://doi.org/10.1101/gad.229310.113>
- Lucas C, Da Costa M, Van Uden N (1990) Osmoregulatory active sodium-glycerol co-transport in the halotolerant

- yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* 6:187–191. <https://doi.org/10.1002/yea.320060303>
- Maayan I, Beenstock J, Marbach I, Tabachnick S, Livnah O, Engelberg D (2012) Osmostress induces autophosphorylation of Hog1 via a C-terminal regulatory region that is conserved in p38a. *PLoS ONE* 7:e44749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044749>
- Mao K, Klionsky DJ (2011) MAPKs regulate mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* 7:1564–1565. <https://doi.org/10.4161/auto.7.12.17971>
- Marquez JA, Serrano R (1996) Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene PMR2/ENA1 during salt stress in yeast. *FEBS Lett* 382:89–92. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00157-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00157-3)
- Martínez JL, Sychrova H, Ramos J (2011) Monovalent cations regulate expression and activity of the Hak1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Genet Biol* 48:177–184. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2010.06.013>
- Mattison CP, Ota IM (2000) Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast. *Genes Dev* 14:1229–1235
- Medina-Córdova N, Rosales-Mendoza S, Hernández-Montiel LG, Angulo C (2018) The potential use of *Debaryomyces hansenii* for the biological control of pathogenic fungi in food. *Biol Control* 121:216–222. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.03.002>
- Michán C, Martínez JL, Alvarez MC, Turk M, Sychrova H, Ramos J (2013) Salt and oxidative stress tolerance in *Debaryomyces hansenii* and *Debaryomyces fabryi*. *FEMS Yeast Res* 13:180–188. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12020>
- Minhas A, Biswas D, Mondal AK (2009) Development of host and vector for high-efficiency transformation and gene disruption in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* 9:95–102. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00457.x>
- Minhas A, Sharma A, Kaur H, Rawal Y, Ganesan K, Mondal AK (2012) Conserved Ser/Arg-rich motif in PPZ orthologs from fungi is important for its role in cation tolerance. *J Biol Chem* 287:7301–7312. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.299438>
- Murakami Y, Tatebayashi K, Saito H (2008) Two adjacent docking sites in the yeast Hog1 mitogen-activated protein (MAP) kinase differentially interact with the Pbs2 MAP kinase and the Ptp2 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* 28:2481–2494. <https://doi.org/10.1128/MCB.01817-07>
- Nadel CM, Mackie TD, Gardner RG (2019) Osmolyte accumulation regulates the sumoylation and inclusion dynamics of the prionogenic Cyc8-Tup1 transcription corepressor. *PLoS Genet* 15(4):e1008115. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008115>
- Neves ML, Oliveira RP, Lucas CM (1997) Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology* 143:1133–1139. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-4-1133>
- Neves L, Oliveira R, Lucas C (2004) Yeast orthologues associated with glycerol transport and metabolism. *FEMS Yeast Res* 5:51–62. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.06.012>
- Norkrans B (1966) Studies on marine occurring yeasts: Growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Archiv Mikrobiol* 54:374–392. <https://doi.org/10.1007/BF00406719>
- Norkrans B (1968) Studies on marine occurring yeasts: Respiration, fermentation and salt tolerance. *Archiv Mikrobiol* 62:358–372. <https://doi.org/10.1007/BF00425641>
- Norkrans B, Kylin A (1969) Regulation of the potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeasts. *J Bacteriol* 100:836–845
- O'Rourke SM, Herskowitz I (2004) Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. *Mol Biol Cell* 15:532–542. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-07-0521>
- Oguro Y, Yamazaki H, Ara S, Shida Y, Ogasawara W, Takagi M, Takaku H (2017) Efficient gene targeting in non-homologous end-joining-deficient *Lipomyces starkeyi* strains. *Curr Genet* 63:751–763. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0679-6>
- Onishi H (1963) Osmophilic yeasts. *Adv Food Res* 12:53–94. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60006-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60006-3)
- Papon N, Courdavault V, Clastre M (2014) Biotechnological potential of the fungal CTG clade species in the synthetic biology era. *Trends Biotechnol* 32:167–168. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.10.006>
- Pereira I, Madeira A, Prista C, Loureiro-Dias MC, Leandro MJ (2014) Characterization of new Polyol/H<sup>+</sup> symporters in *Debaryomyces hansenii*. *PLoS ONE* 9:e88180. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088180>
- Petterson N, Filipsson C, Becit E, Brive L, Hohmann S (2005) Aquaporins in yeast and filamentous fungi. *Biol Cell* 97:487–500. <https://doi.org/10.1042/BC20040144>
- Prista C, Loureiro-Dias MC (2007) *Debaryomyces hansenii*, a salt loving spoilage yeast. A portrait of state-of-the-art research at the Technical University of Lisbon. Springer, Dordrecht
- Prista C, Almagro A, Loureiro-Dias MC, Ramos J (1997) Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl Environ Microbiol* 63:4005–4009
- Prista C, Michán C, Miranda IM, Ramos J (2016) The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast* 33:523–533. <https://doi.org/10.1002/yea.3177>
- Ramos J, Ariño J, Sychrova H (2011) Alkali-metal-cation influx and efflux systems in nonconventional yeast species. *FEMS Microbiol Lett* 317:1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02214.x>
- Ramos J, Melero Y, Ramos-Moreno L, Michán C, Cabezas L (2017) *Debaryomyces hansenii* strains from Valle de los pedroches Iberian dry meat products: Isolation, identification, characterization, and selection for starter cultures. *J Microbiol Biotechnol* 27:1576–1585. <https://doi.org/10.4014/jmb.1704.04045>
- Ramos-Moreno L, Ramos J, Michán C (2019) Overlapping responses between salt and oxidative stress in *Debaryomyces hansenii*. *World J Microbiol Biotechnol* 35:170. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2753-3>
- Rep M, Albertyn J, Thevelein JM, Prior BA, Hohmann S (1999) Different signalling pathways contribute to the control of *GPD1* gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 145:715–727. <https://doi.org/10.1099/1350872-145-3-715>
- Ricaurte ML, Govind NS (1999) Construction of plasmid vectors and transformation of the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. *Mar Biotechnol* (NY) 1:15–19. <https://doi.org/10.1007/pl00011745>
- Rodríguez-González M, Kawasaki L, Velázquez-Zavala N, Domínguez-Martín E, Trejo-Medecigo A, Martagon N, Espinoza-Simon E, Vázquez-Ibarra A, Ongay-Larios L, Georgellis D, de Nadal E, Posas F, Coria R (2017) Role of the Sln1-phosphorelay pathway in the response to hyperosmotic stress in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol Microbiol* 104:822–836. <https://doi.org/10.1111/mmi.13664>
- Sabir F, Loureiro-Dias MC, Prista C (2016) Comparative analysis of sequences, polymorphisms and topology of yeasts aquaporins and aquaglyceroporins. *FEMS Yeast Res*. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow025>
- Saito H, Posas F (2012) Response to hyperosmotic stress. *Genetics* 192:289–318. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.140863>
- Sánchez NS, Calahorra M, González-Hernández JC, Peña A (2006) Glycolytic sequence and respiration of *Debaryomyces hansenii* as compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23:361–374. <https://doi.org/10.1002/yea.1360>
- Sánchez NS, Arreguín R, Calahorra M, Peña A (2008) Effects of salts on aerobic metabolism of *Debaryomyces*

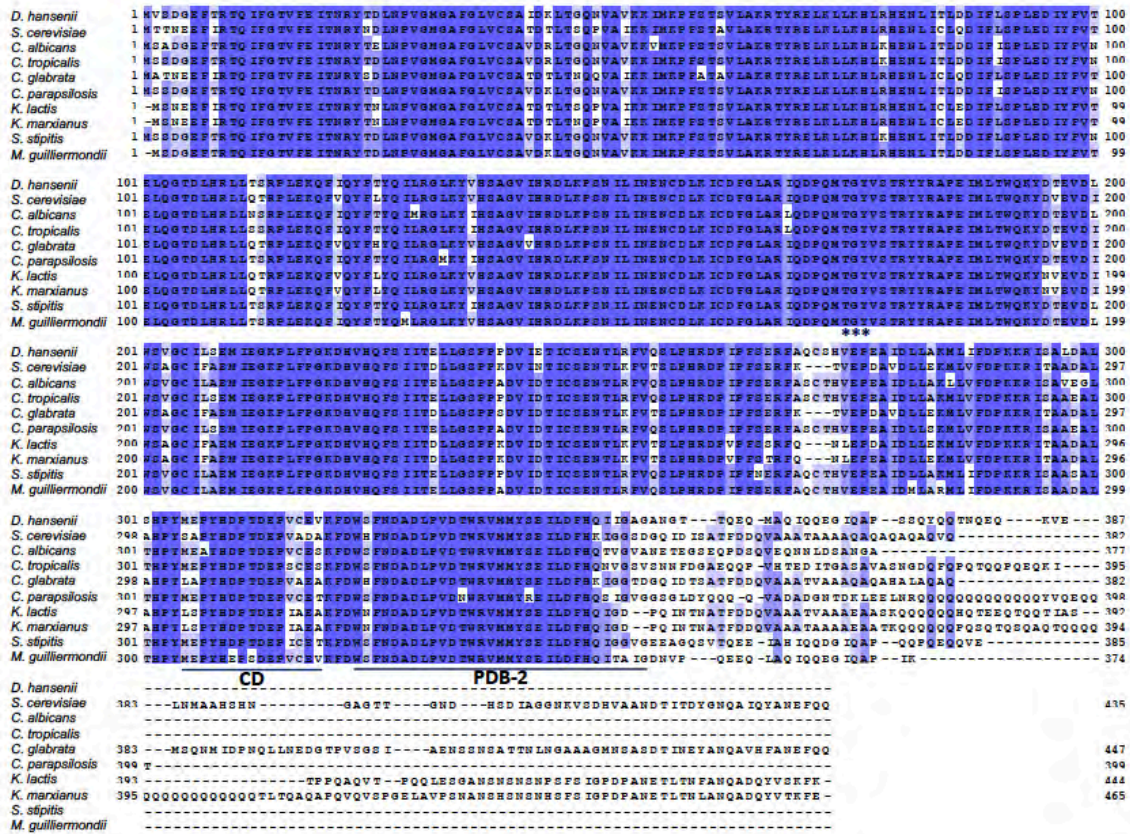
- hansenii*. FEMS Yeast Res 8:1303–1312. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00426.x>
- Sánchez NS, Calahorra M, Ramírez J, Peña A (2018) Salinity and high pH affect energy pathways and growth in *Debaryomyces hansenii*. Fungal Biol 122:977–990. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.07.002>
- Schaber J, Baltanas R, Bush A, Klipp E, Colman-Lerner A (2012) Modelling reveals novel roles of two parallel signalling pathways and homeostatic feedbacks in yeast. Mol Syst Biol 8:622. <https://doi.org/10.1038/msb.2012.53>
- Schmitt ME, Brown TA, Trumppower BL (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res 18:3091–3092. <https://doi.org/10.1093/nar/18.10.3091>
- Schorsch C, Köhler T, Boles E (2009) Knockout of the DNA ligase IV homolog gene in the sphingoid base producing yeast *Pichia ciferrii* significantly increases gene targeting efficiency. Curr Genet 55:381–389. <https://doi.org/10.1007/s00294-009-0252-z>
- Segal-Kischinevzky C, Rodarte-Murguía B, Valdés-López V, Mendoza-Hernández G, González A, Alba-Lois L (2011) The euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii* has two catalase genes encoding enzymes with differential activity profile. Curr Microbiol 62:933–943. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9806-z>
- Sharma P, Mondal AK (2005) Evidence that C-terminal non-kinase domain of Pbs2p has a role in high osmolarity-induced nuclear localization of Hog1p. Biochem Biophys Res Commun 328:906–913. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.01.039>
- Sharma P, Meena N, Aggarwal M, Mondal AK (2005) *Debaryomyces hansenii*, a highly osmo-tolerant and halo-tolerant yeast, maintains activated Dhog1p in the cytoplasm during its growth under severe osmotic stress. Curr Genet 48:162–170. <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0010-9>
- Tekaia F, Blandin G, Malpertuy A, Tekaia F, Blandin G, Malpertuy A, Llorente B, Durrens P, Toffano-Nioche C, Ozier-Kalogeropoulos O, Bon E, Gaillardin C, Aigle M, Bolotin-Fukuhara M, Casarégola S, de Montigny J, Lépingle A, Neuvéglise C, Potier S, Souciet J, Wésolowski-Louvel M, Dujon B (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 3. Methods and strategies used for sequence analysis and annotation. FEBS Lett 487:17–30. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02274-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02274-2)
- Thomé PE (2004) Isolation of a *GPD* gene from *Debaryomyces hansenii* encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>). Yeast 21:119–126. <https://doi.org/10.1002/yea.1070>
- Thomé PE (2005) Heterologous expression of glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene [*DhGPD1*] from the osmotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Microbiol 51:87–90. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-4446-4>
- Thomé PE, Trench RK (1999) Osmoregulation and the genetic induction of glycerol-3-phosphate dehydrogenase by NaCl in the euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii*. Mar Biotechnol 1:230–238. <https://doi.org/10.1007/PL00011772>
- Torres-Quiroz F, García-Marqués S, Coria R, Randez-Gil F, Prieto JA (2010) The activity of yeast Hog1 MAPK is required during endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin exposure. J Biol Chem 285:20088–20096. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.063578>
- Turk M, Montiel V, Žigon D, Plemenitas A, Ramos J (2007) Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. Microbiology 153:3586–3592. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/009563-0>
- Van Wuytswinkel O, Reiser V, Siderius M, Kelders MC, Ammerer G, Ruis H, Mager WH (2000) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway. Mol Microbiol 37:382–397. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02002.x>
- Vázquez-Ibarra A, Subirana L, Ongay-Larios L, Kawasaki L, Rojas-Ortega E, Rodríguez-González M, de Nadal E, Posas F, Coria R (2018) Activation of the Hog1 MAPK by the Ssk2/Ssk22 MAP3Ks, in the absence of the osmosensors, is not sufficient to trigger osmotic stress adaptation in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS J 285:1079–1096. <https://doi.org/10.1111/febs.14385>
- Velázquez-Zavala N, Rodríguez-González M, Navarro-Olmos R, Ongay-Larios L, Kawasaki L, Torres-Quiroz F, Coria R (2015) Ineffective phosphorylation of mitogen-activated protein kinase Hog1p in response to high osmotic stress in the yeast *Kluyveromyces lactis*. Eukaryot Cell 14:922–930. <https://doi.org/10.1128/EC.00048-15>
- Velkova K, Sychrova H (2006) The *Debaryomyces hansenii* *NHA1* gene encodes a plasma membrane alkali-metal-cation antiporter with broad substrate specificity. Gene 369:27–34. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.10.007>
- Voronovsky AA, Abbas CA, Fayura LR et al (2002) Development of a transformation system for the flavinogenic yeast *Candida famata*. FEMS Yeast Res 2:381–388. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00112-5](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00112-5)
- Westfall PJ, Patterson JC, Chen RE, Thorner J (2008) Stress resistance and signal fidelity independent of nuclear MAPK function. Proc Natl Acad Sci USA 105:12212–12217. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805797105>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

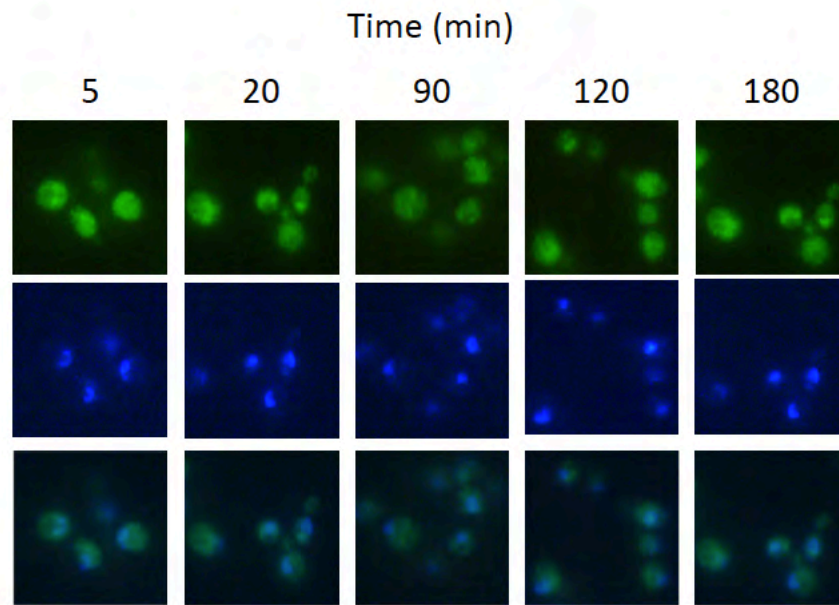
## Supplementary Figures



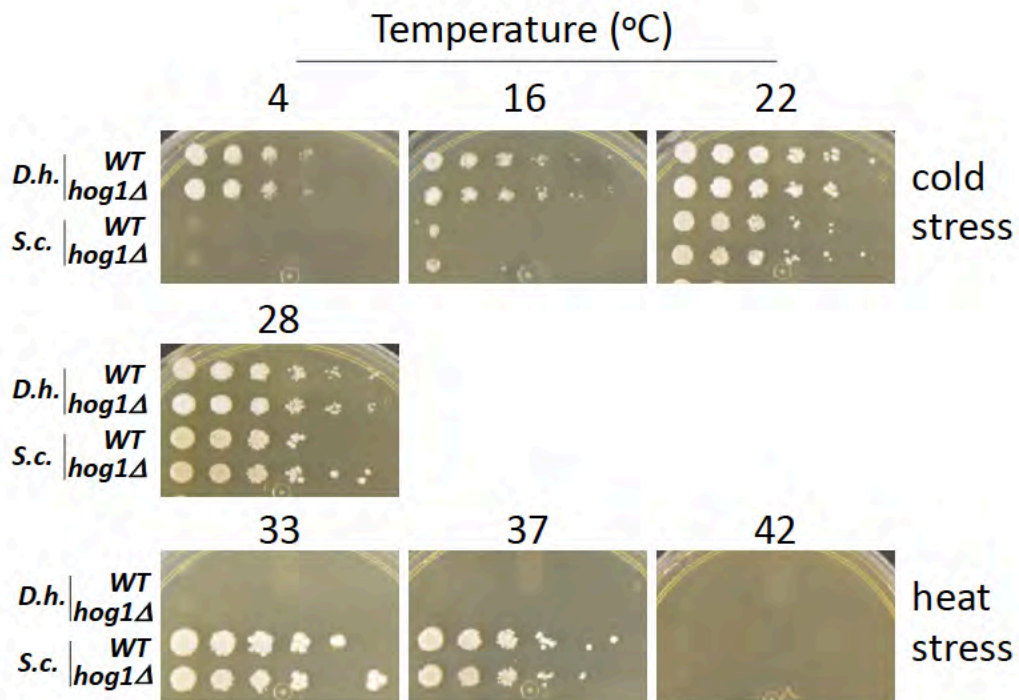
**Fig. S1** Dose-dependent Hog1 phosphorylation in *D. hansenii*. Cells were grown in YPD to mid log phase and treated with the indicated NaCl concentrations for 10 min (*D. hansenii*). Protein extract from *S. cerevisiae* treated with the indicated NaCl concentration, was included in the blot. Total Hog1 was detected with anti-Hog1 antibody and phosphorylated Hog1 was detected in the same stripped membrane with an anti-phospho p38 antibody.



**Fig. S2** Hog1p sequence alignment from various non-conventional yeasts and *S. cerevisiae*. The multiple sequence alignment was made using Clustal Omega multiple sequence alignment from EMBL-EBI and JalView to visualize the alignment. The yeasts compared to *Debaryomyces hansenii* were: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Scheffersomyces stipitis* and *Meyerozyma guilliermondii*. The conserved phosphorylation site TGY is shown with asterisks. The CD (common docking) domain and the PDB2 (Pbs2 binding) domain are indicated. Dark blue corresponds to 100 % identity among species.



**Fig. S3** DhHog1-yeYFP localization after hyperosmotic treatment. Cells carrying the integrated *DhHOG1-yeYFP* hybrid gene were grown to mid-log phase and treated with or without 2M NaCl for the indicated times (min). Representative images of cells showing DhHog1-yeYFP and DAPI (nucleus) are shown. Images were acquired by epifluorescence microscopy.



**Fig. S4** Effect of the temperature in the cell growth. The indicated strains were grown to mid-log phase and adjusted to  $OD_{600} = 1.0$ . Aliquots of 10-fold serial dilution were spotted on YPD plates and incubated at the indicated temperatures during 72 h (from 16°C to 37°C) and for 15 days (4°C and 42°C) and photographed.