

Capítulo 4

Homeostasis iónica y respuestas a estrés salino en levaduras

Navarrete C, Martínez JL, Ramos J¹

Laboratorio de Microbiología Agrícola, Dep. Microbiología, Edificio Severo Ochoa (C6), Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; Tel: 957212527; Fax: 957218650; ¹CE: <mi1raruj@uco.es>

RESUMEN

La homeostasis de cationes es fundamental para cualquier célula viva, especialmente cuando se encuentra en situaciones de estrés salino. Utilizando levaduras como organismo modelo de célula eucariota, se analiza la función de algunos de los transportadores de potasio y sodio así como sus procesos de regulación.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, transporte de potasio, tolerancia a sodio.

Introducción

La regulación del contenido iónico es fundamental para cualquier ser vivo. Este proceso, conocido como homeostasis iónica permite a las células adaptarse a situaciones cambiantes que inducen diversos tipos de estrés. Utilizando levaduras como organismo modelo, nuestro grupo está interesado en el análisis de la homeostasis de potasio, el catión más abundante en el interior celular, y en la homeostasis de sodio, el catión más abundante en la mayoría de los ecosistemas naturales.

Homeostasis de potasio en *Saccharomyces cerevisiae*

En la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae* existen dos transportadores específicos implicados en la entrada de potasio: Trk1 y Trk2 (Haro *et al*, 2000). En el contexto

la cepa silvestre y en los mutantes en los genes de transporte. La levadura seleccionada para este tipo de ensayos ha sido BY4741 que fue la levadura cuyo genoma se secuenció en su momento. La Figura 1 es un resumen de los resultados obtenidos hasta el momento y muestra que, en nuestras condiciones, Trk1 es el principal componente del transportador de potasio ya que su carencia produce importantes defectos en el transporte del catión y, como consecuencia, mayores requerimientos para crecer.

El siguiente objetivo dentro de este proyecto está encaminado a la caracterización del proceso de adaptación del transportador de potasio a situaciones de ayuno. Se conoce desde hace tiempo que esta adaptación requiere varias horas y durante ellas la proteína transportadora transforma sus características hacia un modo de transporte con alta velocidad y alta afinidad por el sustrato pero se conoce poco sobre cómo

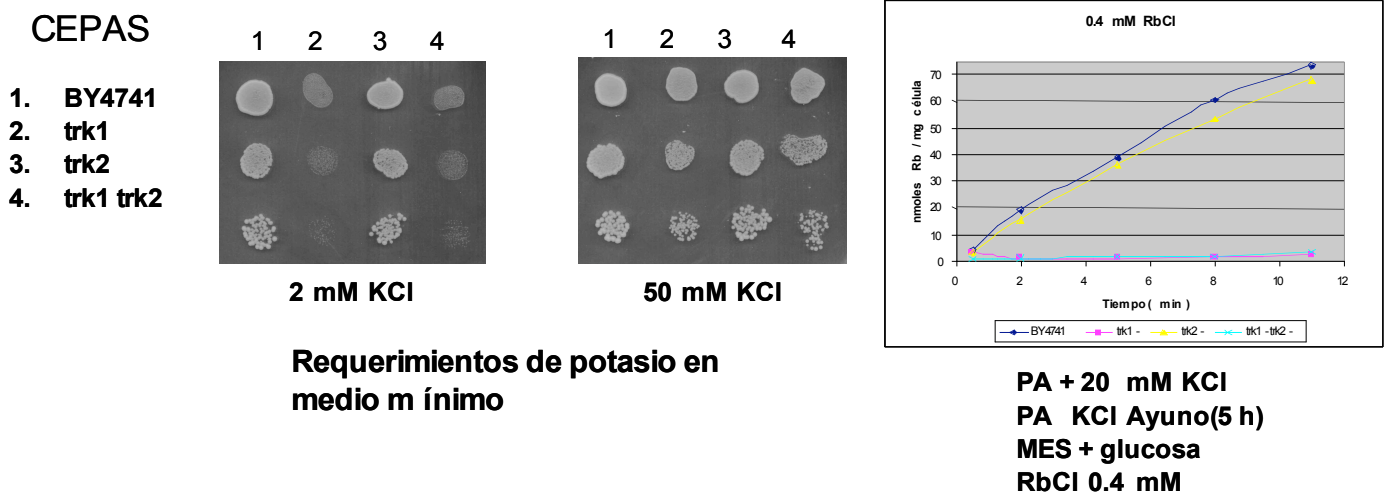


Figura 1. Requerimientos de potasio y transporte de rubidio en *Saccharomyces cerevisiae*. Mutantes en los distintos genes de transporte de K^+ se inocularon en medio mínimo (fosfato de arginina) conteniendo concentraciones limitantes de K^+ . Se realizaron diluciones seriadas que se incubaron a 28 °C durante 72 horas. El transporte de Rb^+ (utilizado como análogo de K^+) se estudió en células ayunadas en este catión durante 5 horas. A tiempo cero $RbCl$ (0.4 mM) se añadió al tampón de ensayo y se tomaron muestras de células durante 15 minutos, las cuales se filtraron, lavaron y analizaron por espectrofotometría de absorción atómica.

de un proyecto en el que intervienen diferentes grupos europeos, se está abordando el tema de la homeostasis de potasio desde un punto de vista multidisciplinar y nuestro grupo está encargado del análisis bioquímico de los flujos de potasio y de los requerimientos del catión en

sucede ese hecho (Ramos *et al*, 1990; Pérez-Valle *et al*, 2007).

Planeamos hacer un estudio detallado de lo que sucede durante ese periodo y caracterizar los factores que

intervienen en la adaptación.

Caracterización genética y determinantes de halotolerancia en *Debaryomyces hansenii*

S. cerevisiae es la levadura por excelencia pero no es ni la única levadura ni probablemente la más interesante en determinados tipos de estudios. Por esta razón también trabajamos con la levadura de ambientes marinos *Debaryomyces hansenii*, que al ser un organismo muy halotolerante permite aproximaciones nuevas al tema de la toxicidad por sal (Prista *et al*, 2005).

Esta levadura es de gran interés y potencial biotecnológico (Breuer y Harms, 2006) y su genoma se secuenció recientemente (Dujon *et al*, 2004), pero la falta de herramientas para una manipulación completa de sus genes ha frenado hasta hoy un mayor desarrollo de la investigación en *Debaryomyces hansenii*. Por este motivo uno de nuestros principales objetivos es la preparación y puesta a punto de toda una serie de protocolos y técnicas encaminadas a: (i) la determinación de la ploidía de diversas cepas de esta levadura usadas en investigación;

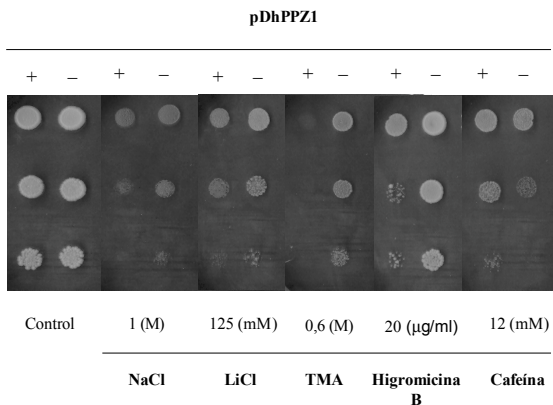
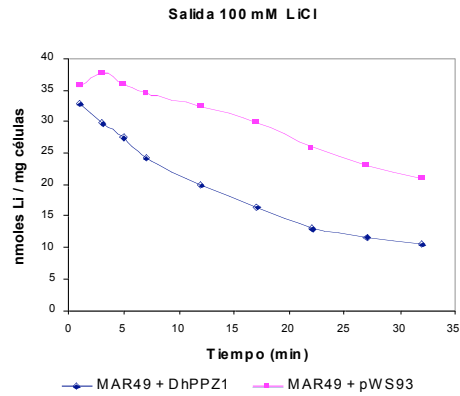


Figura 2. Efecto de la expresión de *DhPPZ1* sobre la sensibilidad a sodio y litio y a determinadas drogas. Los ensayos de crecimiento mediante test de goteo se realizaron mediante la inoculación de los microorganismos y diluciones seriadas de los mismos. La siembra se realizó en medio YPD sólido en presencia de determinadas concentraciones de sodio, litio, TMA, higrmicina B y cafeína. La incubación se realizó a 28 °C y se prolongó entre 24-48 horas.

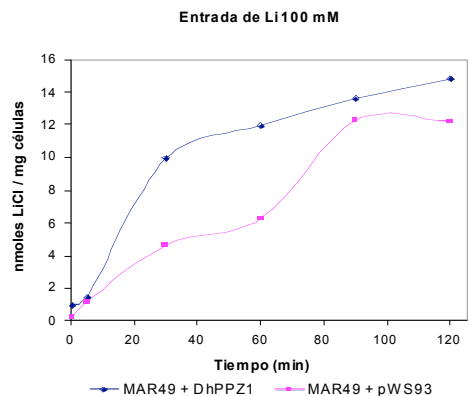
(ii) la obtención de una batería de mutantes con diferentes requerimientos auxotróficos (adenina, leucina, etc); o (iii) la puesta a punto de procedimientos de transformación y selección de clones.

Además, siguiendo con nuestra línea de identificación de nuevos determinantes de halotolerancia en *D. hansenii*, hemos caracterizado recientemente DhPpz1. En la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae* existen dos genes *PPZ* que codifican fosfatasa implicadas en distintos procesos celulares como por ejemplo la tolerancia a sal (Balcells *et al*, 1997; Yenush *et al*, 2002). En este trabajo estamos identificando y hemos clonado el gen *DhPPZ1* de *Debaryomyces hansenii*, y se ha expresado en mutantes *ppz1 ppz2* de *S. cerevisiae*. La comparación en la base de datos "Genolevures" indica una única versión del gen en *D. hansenii*. La expresión del gen *DhPPZ1* en el mutante de *S. cerevisiae* produce fenotipos de sensibilidad a sodio y litio, a los compuestos

tóxicos tetrametilamonio e higrmicina B, y tolerancia a cafeína (Figura 2). El estudio detallado del proceso tolerancia/sensibilidad a sal dependiente de *DhPPZ1* mostró que este gen produjo una mayor sensibilidad de *S. cerevisiae* a litio y sodio debido, no a que reprimió la expulsión del catión tóxico como sucede en *Saccharomyces*, sino a que se estimuló el proceso de entrada de estos cationes tóxicos (Figura 3). En



(a)



(b)

Figura 3. Salida y entrada de litio de mutantes *ppz1,2* de *Saccharomyces* expresando *DhPPZ1*. En el caso del estudio de los flujos de salida de litio en los clones seleccionados (a), las células se crecieron en medio YPD suplementado con 100 mM LiCl a una D.O. de 0.2-0.3. Posteriormente las células se lavaron y resuspendieron en YPD sin litio, se tomaron muestras durante 30 minutos que se trataron como se describe en la Figura 1 (para el caso del Rb) y tras ello se determinó la salida del catión (b). En las entradas de litio, los clones transformantes se crecieron en medio YPD a 28 °C. Las células se lavaron y resuspendieron en tampón MES más glucosa a pH 5.8, al cual se añadió 100 mM Lic. A tiempos se tomaron distintas muestras de células y se analizó el litio como se ha descrito.

objetivos del grupo son el estudio detallado de los procesos reguladores del contenido de potasio en la levadura modelo *S. cerevisiae* y la caracterización del comportamiento halotolerante de *D. hansenii*. Mientras que la primera ha sido estudiada durante décadas por múltiples grupos de investigación, los trabajos con la segunda han quedado ralentizados debido a la falta de herramientas genéticas que permitan su manipulación. Una situación que planeamos resolver a medio plazo.

Agradecimientos

Financiado por BFU2005-06388-C04-03, Ministerio de Educación y Ciencia.

Referencias

- Balcells L, Gómez N, Casamayor A, Clotet J, Ariño J (1997): Regulation of SALT tolerance in fission yeast by a protein-phosphatase-Z-like Ser/Thr protein phosphatase. *Eur J Biochem* 250: 476-483.
- Breuer U, Harms H (2006): *Debaryomyces hansenii* an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* 23: 415-437.
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neuveglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aiglem M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisrame A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, De Daruvar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztas S, Osier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekaiia F, Wesolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet JL (2004): Genome evolution in yeast. *Nature* 430: 35-44.
- Haro R, Rodríguez-Navarro A (2000): Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* 1613: 1-6.
- Perez-Valle J, Jenkins H, Merchan S, Montiel V, Ramos J, Sharma J, Serrano R, Yenush L (2007): Key role for intracellular K⁺ and protein kinases Sat4/Hal4 and Hal5 in the plasma membrane stabilization of yeast nutrient transporters. *Mol Cell Biol* 27: 5725-5736.
- Prista C, Loureiro-Dias MC, Montiel V, García R, Ramos J (2005): Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research* 5: 693-701.
- Ramos J, Haro R, Rodríguez-Navarro A (1990): Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1029: 211-217.
- Yenush L, Mulet JM, Ariño J, Serrano R (2002): The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell type progression. *EMBO J* 21: 920-929.