

Temas de actualidad

Debaryomyces hansenii, una levadura modelo en el estudio de las respuestas a estrés salino

José Ramos Ruiz

Departamento de Microbiología, Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071 Córdoba.
E-mail: mi1raruj@uco.es

Estrés salino y levaduras

Saccharomyces cerevisiae ha sido y es la levadura modelo por excelencia para microbiólogos y bioquímicos. De su importancia da idea el hecho de que fue la primera célula eucariota cuyo genoma se secuenció durante los años 90. En relación con el estrés salino, se sabe que *S. cerevisiae* basa sus estrategias fundamentales de tolerancia en el funcionamiento y regulación de los transportadores de sodio y potasio (principalmente Ena y Trk) intentando evitar una relación Na^+/K^+ demasiado alta en el citoplasma, lo que intoxicaría a las células. Desde hace algunos años el número de especies de levaduras objeto de estudio se ha visto incrementado ya que éstas pueden ser más informativas que *S. cerevisiae* en muchos aspectos concretos de la investigación. Así, *Debaryomyces hansenii*, puede resultar un sistema más apropiado para estudiar las respuestas a estrés salino. Esta levadura, además de aparecer en embutidos y contribuir a la maduración de quesos, crece bien a pHs próximos a la neutralidad o ligeramente básicos y se ha aislado de ambientes marinos. Se ha demostrado que no se intoxica por concentraciones internas de sodio que envenenarían a levaduras modelo como *S. cerevisiae* o como *Schizosaccharomyces pombe* (Figuras 1 y 2). Además *D. hansenii* es una levadura ascomicética, lo cual la aproxima evolutivamente a *S. cerevisiae* y su genoma ha sido recientemente secuenciado, lo que facilita sin duda alguna su abordaje genético (Dujon *et al.*, 2004). Un inconveniente serio a la hora de realizar genética clásica en esta levadura es que a pesar de ser haploide, a veces la yema hija fusiona con la madre y forma un núcleo diploide que entra inmediatamente en meiosis. De las cuatro esporas, tres degeneran y queda una que es la que germina y forma una nueva célula haploide. Finalmente, es razonable esperar que su estudio facilite la comprensión de procesos relacionados con respuestas a estrés salino en plantas o con el desarrollo de hongos invasores como *Candida* o *Aspergillus* que

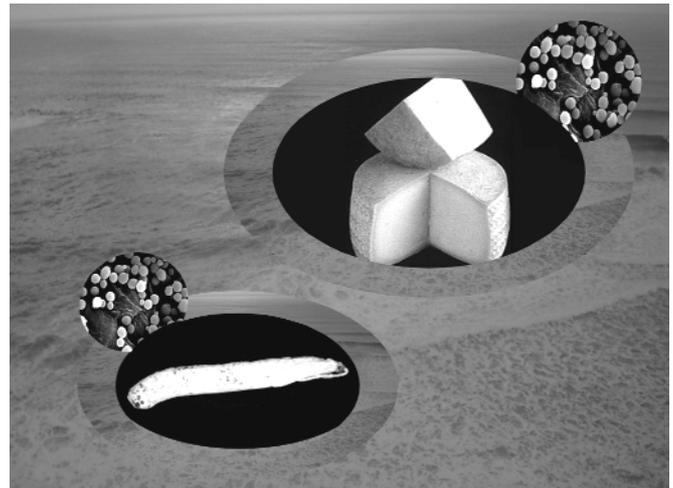


Figura 1. *Debaryomyces hansenii* se encuentra habitualmente en aguas salinas y también en alimentos como embutidos o quesos madurados.

se desarrollan en el plasma a concentraciones altas de sodio.

Halotolerancia y/o halofilismo

Desde los primeros estudios del grupo de la Universidad de Goteborg en los años 60, *D. hansenii* ya fue aislada de agua de mar y caracterizada como una de las levaduras más tolerantes a sal aisladas de esos ecosistemas (Norkrans, 1966; Norkrans y Kylin, 1969). Posteriormente, en la segunda mitad de los años 90, nuestro grupo propuso que, en base a sus características fisiológicas, esta levadura podría considerarse como halófila (Prista *et al.*, 1997). En aquellos momentos, esta idea muy novedosa se aplicaba por primera vez a levaduras y despertó inmediatamente una polémica que aún hoy persiste y que ha servido, al menos, para dinamizar este campo.

Volviendo a la polémica sobre el carácter halófilo o halotolerante de *D. hansenii*, el problema radica más en nuestras definiciones que en el comportamiento del microorganismo, que resulta claro. De manera muy resumida, la situación es la siguiente:

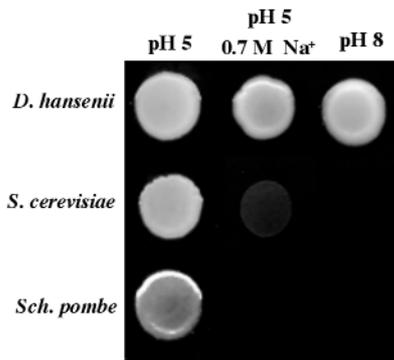


Figura 2. Crecimiento de *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* en presencia de distintas condiciones de estrés.

¿Necesita *D. hansenii* sodio para crecer? Definitivamente no, ya que *D. hansenii* crece perfectamente en los medios de laboratorio usuales sin necesidad de añadir sodio. En el caso de medios complejos podría argumentarse que el sodio presente en concentraciones milimolares podría enmascarar las necesidades reales de sodio por parte de la levadura. Sin embargo en nuestro laboratorio hemos demostrado que en medios sintéticos en los que la contaminación de sodio es extremadamente baja (menos de 10 μ M) la levadura crece sin problemas aparentes. Desde este punto de vista *D. hansenii* no puede considerarse un organismo halófilo.

Por otra parte, diferentes grupos de investigación hemos demostrado que niveles altos de sodio (del orden de 0,5 M NaCl) mejoran ligera pero significativamente la velocidad de crecimiento de la levadura. Además la presencia de sodio en el medio protege a la levadura frente a factores adicionales de estrés abiótico y así, a pH alcalino o a altas temperaturas (condiciones en las que presenta un desarrollo bastante pobre) la adición de sodio mejora de manera sustancial el crecimiento celular. Finalmente hay que añadir que en las aguas saladas los niveles de potasio (catión necesario para todas las células vivas) son mucho más bajos que los de sodio y muy probablemente *D. hansenii* utiliza sodio para cubrir parcialmente sus requerimientos de potasio.

Todo ello, dividió a la comunidad científica que utiliza *D. hansenii* entre aquellos que pensábamos que este organismo tenía un comportamiento halófilo y los que pensaban que este término no era adecuado y que debería usarse el concepto de halotolerante para referirse a sus características. Como he adelantado anteriormente esta polémica ha sido reavivada muy recientemente con una nueva propuesta que ha añadido más entropía al sistema, la creación del concepto “*salt-loving*

yeast”. La clave reside en que seguimos sin comprender las razones que, en última instancia, permiten a *D. hansenii* desarrollarse en ambientes tan salinos como el agua de mar.

Una breve reseña histórica

Diferentes aspectos de los procesos de tolerancia a sal en la levadura *D. hansenii* fueron estudiados por el grupo de levaduras de la Universidad de Goteborg durante varias décadas (años 60 a 90). Como consecuencia, proporcionaron unas bases muy sólidas para el conocimiento de esta levadura. Una de sus conclusiones fue que de una colección de levaduras marinas, *D. hansenii* era la menos afectada por altas concentraciones externas de NaCl (Norkrans 1966; Norkrans y Kylin, 1969). Posteriormente, y salvo algunas excepciones, escasean las aportaciones de interés al tema hasta que en los años 90 diversos grupos, entre ellos el nuestro, consideran que un organismo sólo moderadamente tolerante a sal como lo es *S. cerevisiae*, puede no ser el mejor modelo para estudiar fenómenos de halotolerancia/halofilismo en levaduras. En ese periodo se caracteriza en detalle el crecimiento de la levadura en presencia de diferentes concentraciones salinas, se realiza un estudio cinético de los flujos de potasio y sodio, se confirma la existencia de procesos de expulsión de sodio al exterior, y se propone la existencia de diversos transportadores mediando el transporte de potasio y sodio (Prista *et al.*, 1997; Thomé-Ortiz *et al.*, 1998). Asimismo, se define *D. hansenii* como un organismo inclusor de sodio que acumula cantidades altas del catión sin aparentes signos de intoxicación, se determina que el glicerol es el principal soluto compatible y se propone por primera vez en levadura la existencia de un simporte con sodio, que introduciría glicerol y sodio en la célula (Lucas *et al.*, 1990). Se realiza un estudio de su metabolismo en presencia de estrés salino y, en definitiva, se caracteriza bioquímicamente la levadura (Ver Prista *et al.*, 2005 para una revisión reciente).

Con la llegada del nuevo siglo, la genética molecular alcanza también a *D. hansenii* y comienzan a aparecer trabajos en los que se clonan algunos genes y, ya que no disponemos aún de la posibilidad de interrumpir dichos genes en *D. hansenii*, la alternativa es expresarlos en *S. cerevisiae* para obtener información sobre su posible función. De esta manera nuestro grupo publicó la existencia de los genes *ENA1* y *ENA2*, los primeros relacionados específicamente con la tolerancia a estrés salino; al igual que en otros organismos el producto génico sería una ATPasa encargada de

expulsar el exceso de sodio al exterior (Figura 3) (Almagro *et al.*, 2001). Al mismo tiempo se ha publicado también la existencia de genes implicados en la respuesta a estrés osmótico, genes que previamente habían sido identificados en otras levaduras como *Saccharomyces*.

Otra aproximación llevada a cabo por nuestro grupo ha consistido en transformar una cepa silvestre de *S. cerevisiae* con una genoteca de *D. hansenii*, para obtener clones más tolerantes a sal que la cepa silvestre de *S. cerevisiae*, los genes implicados se están identificando en la actualidad. Hay que resaltar que recientemente se ha publicado la secuencia completa del genoma de *D. hansenii*, lo que va a contribuir al avance del estudio de estos procesos de manera muy significativa (Dujon *et al.*, 2004).

Nuestra línea de investigación

Como se desarrolla más adelante, nosotros pensamos que la capacidad de tolerar un estrés salino y/o un pH alcalino (condiciones características del agua de mar) no puede explicarse en base a una razón única. Por tanto, actualmente abordamos el estudio de las respuestas a estrés desde una perspectiva multidisciplinar.

Resulta evidente que un factor primordial en la respuesta a situaciones de estrés debe ser adaptar las características de la membrana plasmática de acuerdo con las condiciones externas. Nuestro grupo está determinando la fluidez y analizando la composición lipídica de la membrana plasmática en células crecidas en diversas condiciones de estrés. Al igual que en otros hongos, nuestros resultados indican la existencia de tres dominios de fluidez muy poco afectados por cambios en la concentración salina del medio pero muy influenciados por el pH externo. Así, a pH 4 el dominio más rígido se incrementa indicando una situación de estrés para la célula. En este contexto, conviene recordar que *D. hansenii* es una levadura que se desarrolla bien a pHs relativamente altos. De igual manera, la relación esteroides/fosfolípidos de la membrana plasmática (que es un indicador del estado de la membrana frente a una condición determinada) se incrementa sistemáticamente cuando las células se desarrollan en presencia de una condición de estrés. Todos estos resultados indican que la composición y fluidez de la membrana plasmática de *D. hansenii* probablemente es un determinante esencial para la tolerancia a estrés salino y al pH alcalino.

Por otra parte, y tras un estudio genómico y proteómico en colaboración con otros grupos,

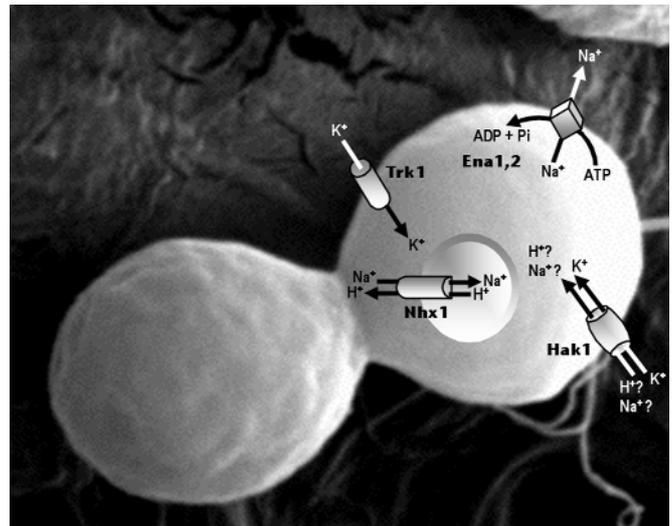


Figura 3. Transportadores de potasio y sodio de *Debaryomyces hansenii* identificados y estudiados molecular y bioquímicamente. A pesar de los múltiples transportadores y canales de potasio y sodio propuestos, sólo los que aparecen en la figura han sido demostrados a nivel de gen y han sido o están siendo estudiados bioquímicamente

hemos seleccionado una serie de genes/proteínas que presumiblemente están implicadas en los procesos que estudiamos. Estos productos aparecen recogidos en la Tabla 1. De todos ellos, *HAL2*, *GZF3*, *HAK1*, y *GPD* podrían ser de especial interés por las particularidades que poseen:

Hal2 es la única diana importante de litio y sodio actualmente identificada en organismos como *S. cerevisiae* o *Arabidopsis thaliana*. *Hal2* es una fosfatasa que hidroliza 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato (PAP) a AMP y cuya inhibición provoca la acumulación de PAP que inhibe la asimilación de sulfato y el procesado de ARN (Murguía *et al.*, 1996). Tanto nuestro grupo como otros hemos identificado la existencia de un ortólogo de *HAL2* en *D. hansenii*. Recientemente se ha publicado que la proteína de *D. hansenii* es resistente a litio (Aggarwal *et al.*, 2005) y nuestro grupo está actualmente trabajando para purificarla, cristali-

Tabla 1. Genes de *Debaryomyces hansenii* implicados en tolerancia a sal.

Gen	Función conocida	Ortólogo en <i>S. cerevisiae</i>
<i>TRK1</i>	Transporte de K ⁺	Si
<i>TDH1</i>	Glucolisis	Si
<i>HAK1</i>	Transporte de alta afinidad de K ⁺	No
<i>ENA1-2</i>	ATPasa de expulsión de Na ⁺	Si
<i>HAL2</i>	Fosfatasa sensible a sal	Si
<i>NHX1</i>	Antiportador Na ⁺ /H ⁺	Si
<i>GZF3</i>	Factor de transcripción NCR	Si

José Ramos Ruiz es Profesor Titular del Departamento de Microbiología de la Universidad de Córdoba e imparte docencia en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes. Su Tesis Doctoral (1984), dirigida por el Profesor Alonso Rodríguez-Navarro, versó sobre los procesos de transporte de potasio en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Ha realizado estancias postdoctorales en la Universidad del Estado de Nueva York en Stony Brook y en la Universidad Católica de Lovaina. Actualmente es Investigador Principal del proyecto BMC2002-0411 (antiguo MCYT) y de dos Proyectos en colaboración con la Universidad de Lisboa (HP2003-0050, antiguo MCYT) y la de Ljubljana (MAEC).



Una de sus líneas prioritarias de investigación se enfoca hacia el estudio de las bases fisiológicas y moleculares de la homeostasis iónica y de la tolerancia a estrés salino en la levadura marina *Debaryomyces hansenii*.

zarla y determinar su estructura.

Un ortólogo a *DhGZF3* existe en *Candida albicans* y en *S. cerevisiae*, en el caso de esta última se sabe que es un factor de transcripción implicado en los procesos de represión catabólica por nitrógeno y, con excepción de un ligero defecto del crecimiento en presencia de lactato, ningún otro fenotipo ha sido descrito en el mutante correspondiente. Nosotros hemos encontrado que la sobre-expresión del gen de *Debaryomyces* en una cepa silvestre de *S. cerevisiae* produce diversos fenotipos “sorprendentes” entre los que destacan una mayor tolerancia a pH alcalino y más sensibilidad a estrés salino. Curiosamente, ni la inactivación por interrupción del gen de *S. cerevisiae*, ni la sobre-expresión del mismo tienen efecto alguno en esta levadura.

Un estudio preliminar del proteoma de *D. hansenii* ha revelado que la expresión de un enzima clave de la glucólisis, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) es estimulada en presencia de concentraciones elevadas de sodio. Es interesante señalar que estudios in vitro han mostrado que esta enzima es sensible a sodio y que en *S. cerevisiae* la respuesta al estrés salino es justo la contraria, la expresión del enzima disminuye ante la presencia de NaCl. Esta respuesta diferencial puede representar un importante determinante de halotolerancia en *D. hansenii*.

Hak1 es otro candidato de interés. Se trata de un transportador de potasio de alta afinidad por el catión (Figura 3). Es sabido que la regulación de

los flujos iónicos es fundamental en la respuesta a estrés salino y de pH. *HAK1* fue identificado inicialmente en *Debaryomyces occidentalis* (previamente conocido como *Schwanniomyces occidentalis*) una búsqueda de genes similares indica que no existen ortólogos a este gen en levaduras sensibles a estrés salino como *S. cerevisiae* o *Sch. pombe*. La expresión de *DhHAK1* en un mutante de *S. cerevisiae* carente de sus propios transportadores de potasio, mejora las características de transporte de dicho catión y la tolerancia a sodio en esas cepas.

Resumen, hipótesis y perspectivas futuras.

En resumen, pensamos que *D. hansenii* constituye una herramienta valiosísima en el estudio de las respuestas y tolerancia a estrés salino. Nuestra hipótesis de trabajo es que no existe una razón única para explicar el proceso de tolerancia sino que todo un conjunto de factores actúan de manera coordinada y cooperativamente y contribuyen en diversa medida al proceso. De esta manera, tendríamos un rompecabezas en el que cada pieza realizaría su aportación particular y cuyo resultado final sería que *D. hansenii* puede desarrollarse en ecosistemas salinos. Nuestro objetivo es identificar cada uno de los componentes de este sistema y evaluar la contribución específica de cada uno al conjunto global. Parece claro que los mejores resultados para responder a nuestras preguntas vendrán desde una órbita multidisciplinar y desde esta perspectiva llevamos a cabo una aproximación bioquímica, genómica y proteómica. La publicación del genoma de *D. hansenii* abre grandes posibilidades para avanzar más y más rápido pero es indiscutible que necesitamos desarrollar herramientas moleculares para la manipulación de esta levadura. La comprensión de fenómenos básicos como son los procesos de tolerancia a sal en *D. hansenii* debe contribuir a ampliar la perspectiva que tenemos sobre el papel de esta levadura en microbiología de alimentos, ya que se desarrolla en quesos y embutidos, y para entender el comportamiento de organismos como las plantas superiores cuando se desarrollan en ecosistemas salinos.

Agradecimientos:

Nuestra investigación está subvencionada actualmente por los proyectos BMC2002-0411, HP2003-0050 y un proyecto conjunto de cooperación bilateral hispano-eslovena 04-05. Vera Montiel y Raúl García realizan su Tesis

Doctoral trabajando con *D. hansenii*. Parte de nuestra labor la realizamos en colaboración con los grupos de A. Albert (Madrid), C. Gil (Madrid), M. C. Loureiro Dias (Lisboa) y de A. Plemenitas (Ljubljana).

Referencias

- Aggarwal M, Bansal PK, Mondal AK (2005) Molecular cloning and biochemical characterization of a 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase from *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* 22: 457-70
- 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
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, *et al.* (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* 430: 35-44
- 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
- Murguía JR, Belles JM, Serrano R (1996) The yeast HAL2 nucleotidase is an in vivo target of salt toxicity. *J Biol Chem* 271:29029-33
- Norkrans B (1966) Studies on marine occurring yeasts: growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Arch Mikrobiol* 54: 374-392
- 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.
- Prista C, Almagro A, Loureiro-Dias MC, Ramos J (1997) Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl Environ Microbiol* 63: 4005-9
- Prista C, Loureiro-Dias M C, Montiel V, García R, Ramos J (2005) Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research* 5: 693-701
- Thomé-Ortiz PE, Peña A, Ramirez J (1998) Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentrations of KCl and NaCl. *Yeast* 14: 1355-1371