

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



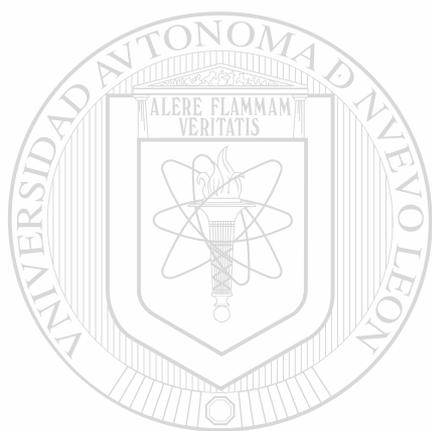
OBTENCION Y CARACTERIZACION DE CELULAS DE
LEVADURA CON DISFUNCION PEROXISOMAL
INDUCIDA POR LA PEROXISOMICINA A1

Por:

Q.C.B. RIGOBERTO VARGAS ZAPATA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en
Morfología

Diciembre, 1998

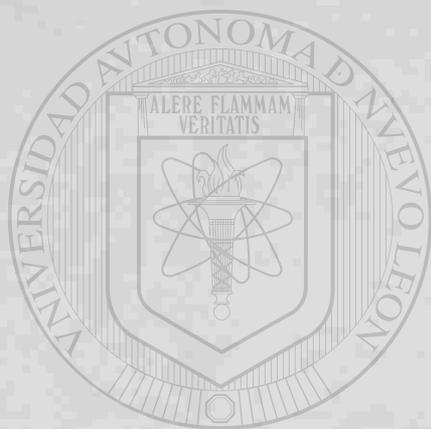


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD
QK495
.R45
V3
c.1



1080082467



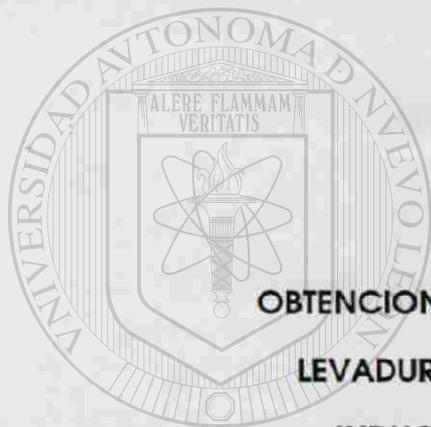
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

- 9618

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**OBTENCION Y CARACTERIZACION DE CELULAS DE
LEVADURA CON DISFUNCION PEROXISOMAL
INDUCIDA POR LA PEROXISOMICINA A1**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por:



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

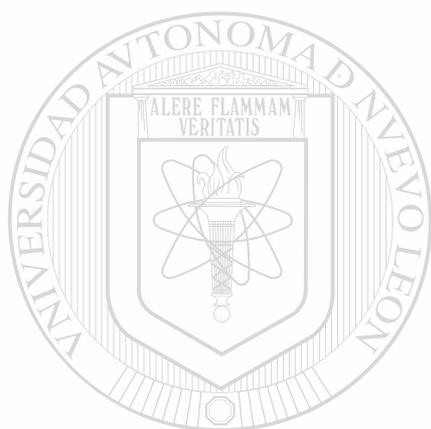
Q.C.B. RIGOBERTO VARGAS ZAPATA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en
Morfología**

Diciembre, 1998



. 45⁵
v3



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

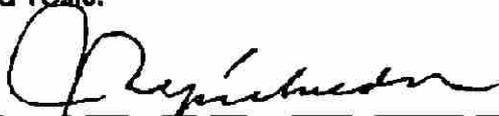


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

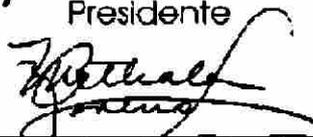


**OBTENCION Y CARACTERIZACION DE CELULAS DE
LEVADURA CON DISFUNCION PEROXISOMAL
INDUCIDA POR LA PEROXISOMICINA A1**

Aprobación de la Tesis:



M.C.P. y Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra
Presidente



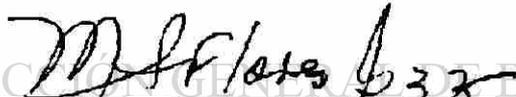
Dr. en. nat. Myrthala Moreno
Secretario



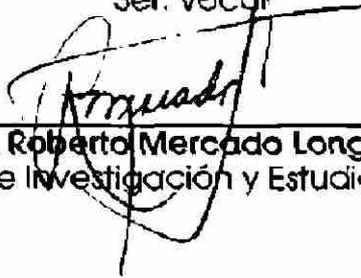
Dr. med. Alfredo Piñeyro López
1er. vocal



Dra. Noemi Waksman de Torres
2do. vocal



Dra. Ma. del Socorro Flores de Castañeda
3er. vocal

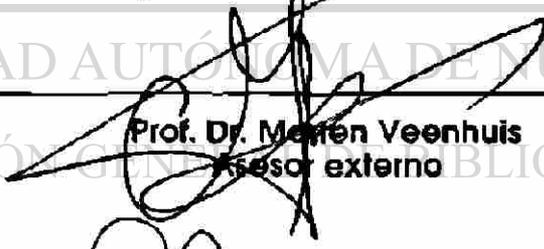


Dr. Roberto Mercado Longoria
Subdirector de Investigación y Estudios de Posgrado

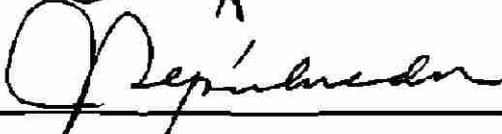
**OBTENCION Y CARACTERIZACION DE CELULAS DE
LEVADURA CON DISFUNCION PEROXISOMAL
INDUCIDA POR LA PEROXISOMICINA A1**

Presentado por Q.C.B. Rigoberto Vargas Zapata

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Centro Biológico de la Universidad de Groningen, Holanda, bajo la asesoría externa del Prof. Dr. Marten Veenhuis, y del asesor interno M.C.P. y Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y co-asesor la Dr. ren. nat. Myrthala Moreno Sepúlveda del Departamento de Farmacología y Toxicología de la U.A.N.L.



Prof. Dr. Marten Veenhuis
Asesor externo



M.C.P. y Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra
Asesor Interno



Dr. ren. nat. Myrthala Moreno Sepúlveda
Co-Asesor

DEDICATORIA

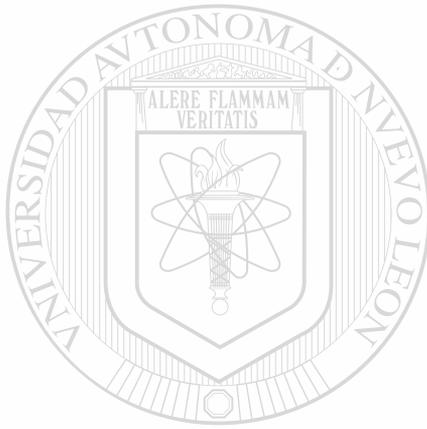
A mi familia "Nutria" con todo mi cariño

Vlady, la Nutria mayor

Cristy, la Nutrita y

Edgar, el Nutrito

los amo....



UANL
...el Nutria

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por el amor que me brinda, y por que solo él puede soportar, comprender y perdonar la inmadurez de mis actos.

A mi padres, el "Profe Vargas" y mi "cándida" madre, por el amor que siempre me han demostrado, nunca podré retribuirles todo lo que me han brindado.

A mis hermanos, por que a lado de sus conyugues e hijos siempre me han apoyado en todas y cada una de las empresas que he iniciado.

I would like to thank to Dr. Marten Veenhuis for giving me the opportunity to work in his laboratory, for kind hospitality and for his contributions on this thesis.

I am grateful to the people from the "Yeasts group" whose assisted me during my stay in the "molen country": Ineke, Zagers, Klass, Jan, Hans, Faber, Ida, Grietje, Engel, Robert, Melchior, and Vladimir, bedank voor hun, kritiek, suggesties en altijd vriendelijke conversaties.

A la Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda, por brindarme la primera fuente de trabajo en la Universidad, por aceptarme en su grupo de trabajo y por motivarme a desempeñar mis quehaceres con disciplina y responsabilidad.

Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, por su paciencia y calidad profesional, por brindarme la oportunidad de iniciarme en la docencia de la Histología, por aceptarme como estudiante de pos-grado en la especialidad de Morfología y por su significativa asesoría.

Al Dr. Alfredo Piñeyro López, por brindarme la oportunidad de formar parte del personal del Departamento de Farmacología y Toxicología, por la excepcional confianza que siempre me ha ofrecido y por su paciencia para revisar esta tesis.

A la comisión de tesis por sus valiosas observaciones a la presente.

A mis maestros, por sus invaluable enseñanzas.

A mi comadre Magda, por su amistad, cariño y profesionalismo ejemplar.

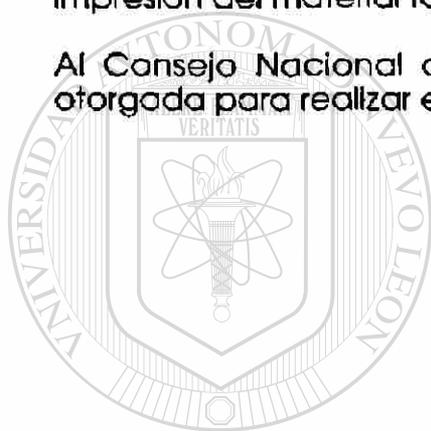
A mis amigos, por soportar mi particular forma de ser, que según ellos, "ni volviendo a nacer" cambiaría, en especial a Laura Mónica y Adriana por su ayuda altruista durante mi estancia en "el país de los molinos".

A Marco Flores, por su amistad y gentil colaboración siempre necesaria en el área de la computación.

A todo el personal del Departamento de Farmacología y Toxicología que de una manera u otra han contribuido a hacer mas placentera mi existencia.

A Víctor, del Departamento de Histología, por su generosa ayuda en la impresión del material fotográfico presentado en este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca #85658 otorgada para realizar este doctorado.



UANL

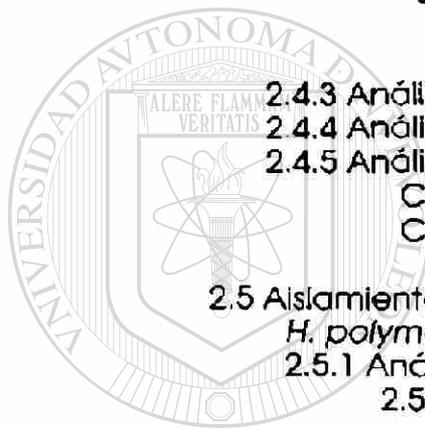
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Peroxisomas.....	4
1.1.1 Introducción.....	4
1.1.2 Función.....	5
1.1.3 Morfología.....	5
1.1.4 Aislamiento y Propiedades Físicas.....	6
1.1.5 Biogénesis.....	6
1.1.6 Recambio y Degradación Peroxisomal.....	7
1.1.7 Enfermedades Peroxisomales.....	8
1.2 <i>Hansenula polymorpha</i>	9
1.2.1 Inducción Peroxisomal.....	9
1.2.2 Análisis Molecular y Genético.....	11
1.3 Antecedentes Experimentales.....	12
1.4 Hipótesis de Trabajo y Objetivos.....	14
2. MATERIAL Y METODOS.....	15
2.1 Material Biológico.....	15
2.2 Equipo y Reactivos.....	15
2.3 Método de Cultivo.....	16
2.3.1 Cultivo Primaria y Pre-cultivo.....	16
2.3.2 Cultivos bajo Condiciones de Inducción de la Proliferación de Peroxisomas.....	17
2.3.3 Determinación de la Fase de Crecimiento Óptima de <i>H. polymorpha</i> para el Estudio del Efecto de la Peroxisomicina A1.....	18
2.3.3.1 Evaluación de la Fase de Crecimiento Óptima.....	19
2.3.3.1.1 Análisis Ultraestructural.....	19
2.3.3.1.2 Análisis de la Cinética de Crecimiento Celular.....	19



2.3.4 Estudio del Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre Células de <i>H. polymorpha</i>	19
2.3.4.1 Cultivos con una Dosis no letal de Peroxisomicina A1	19
2.3.4.2 Evaluación del Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre los Peroxisomas de <i>Hansenula polymorpha</i>	20
2.3.5 Aislamiento de Células con Disfunción Peroxisomal ..	20
2.4 Evaluación de la Función Peroxisomal en las Células CEI ..	22
2.4.1 Análisis Ultraestructural	22
2.4.2 Análisis Fisiológico.....	23
2.4.2.1 Análisis de la Capacidad de Utilización de Metanol	23
2.4.2.2 Análisis de la Capacidad de Utilización de Glucosa, Etanol, Metilamina y Glicerol.....	23
2.4.3 Análisis Bioquímico	24
2.4.4 Análisis Citoquímico e Inmunocitoquímico	24
2.4.5 Análisis Ultraestructural, Bioquímico y Citoquímico e Inmunocitoquímico bajo Condiciones Quimiostáticas	26
2.5 Aislamiento y Caracterización de Células de <i>H. polymorpha leu1-1</i> con Disfunción Peroxisomal	26
2.5.1 Análisis Genético.....	27
2.5.1.1 Obtención de Células CEI con Marcador Auxotrófico <i>ura</i>	27
2.5.1.2 Ensayos de Complementación.....	28
2.5.1.3 Análisis de Esporas al Azar	28
2.6 Análisis Estadístico.....	29
3. RESULTADOS.....	30
3.1 Evaluación de las Condiciones Óptimas de Cultivo	30
3.1.1 Análisis Ultraestructural	30
3.1.2 Análisis de la Cinética de Crecimiento Celular.....	32
3.2 Evaluación del Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre los Peroxisomas de <i>Hansenula polymorpha</i>	33
3.3 Aislamiento de Células con Disfunción Peroxisomal	34
3.4 Evaluación de la Función Peroxisomal en las Células Experimentales	35

3.4.1 Análisis Ultraestructural	35
3.4.2 Análisis de la Función Peroxisomal	39
3.4.3 Análisis Bioquímico	42
3.4.4 Análisis Citoquímico e Inmunocitoquímico	43
3.4.5 Análisis bajo Condiciones Quimioestáticas (Ultraestructural, Bioquímico, Citoquímico e Inmunocitoquímico)	45
3.5 Aislamiento y Caracterización de Células de <i>H. polymorpha leu1-1</i> con Disfunción Peroxisomal	49
3.5.1 Análisis Genético	58
3.5.1.1 Obtención de Células CEI con Marcador Auxotrófico <i>ura⁻</i>	58
3.5.1.2 Ensayos de Complementación y Análisis de Esporas al Azar	58

4. DISCUSION	60
--------------------	----

5 CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES	71
---	----

BIBLIOGRAFIA	73
--------------------	----

APENDICES

APENDICE A.- Métodos de Cultivo de Levaduras	80
Composición de los Medios de Cultivo	80
Condiciones de Esterilización de los Medios de Cultivo	82
Determinación del Crecimiento Exponencial	82
Control de Calidad de los Cultivos	84
APENDICE B.- Técnicas de Inclusión en Resina Epóxica para Microscopía Electrónica de Transmisión	85
Obtención de Esferoplastos y Técnica de Inclusión para Microscopía Electrónica	86
APENDICE C.- Carta de aceptación para publicar parte de esta tesis doctoral en la revista <i>Toxicon</i>	88

LISTA DE TABLAS

TABLA	Página
TABLA 1. Análisis Morfométrico de Peroxisomas en <i>Hansenula polymorpha</i> en Relación a las Condiciones de Cultivo.....	10
TABLA 2 Substratos que Inducen Peroxisomas y Enzimas Peroxisomales en <i>Hansenula polymorpha</i>	11
TABLA 3. Actividad Específica de Alcohol Oxidasa y Catalasa en Células Control y Células Experimentales Tipo I.....	43
TABLA 4. Actividad Específica de Alcohol Oxidasa y Catalasa en Células Control y Células Experimentales Tipo II.....	54
TABLA 5. Análisis de Esporas al Azar.....	59

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Modelo de Biogénesis Peroxisomal.....	7
2. Micrografías Electrónicas de Transmisión de Células de <i>H. polymorpha</i> Durante el Crecimiento en Glucosa y Metanol	31
3. Cinética de Crecimiento Celular en Metanol de <i>Hansenula polymorpha</i>	32
4. Micrografías Electrónicas de Transmisión de Células de <i>Hansenula polymorpha</i> Incubadas en Presencia de 5 µg/mL de Peroxisomicina A1	33
5. Técnica de Replicación en Placa para el Aislamiento de Células con Disfunción Peroxisomal	34
6. Micrografías Electrónicas de Transmisión de Células Control y Células CEI durante el Crecimiento en Metanol.....	36
7. Micrografías Electrónicas de Transmisión de las Células CEI. Asociación Membrana pre-autofágica-peroxisoma	37
8. Micrografías Electrónicas de Transmisión de las Células CEI. Desorganización y Muerte Celular	38
9. Cinética de Crecimiento Celular y Utilización de Metanol por las Células Control y Células CEI.....	39
10. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control y Células CEI en Glucosa/Sulfato de Amonio	40
11. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control y Células CEI en Etanol/Sulfato de Amonio.....	41
12. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control y Células CEI en Glucosa/Metilamina.....	41
13. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control y Células CEI en Glicerol/Sulfato de Amonio	42
14. Micrografías Electrónicas de Transmisión del Análisis Citoquímico e Inmunocitoquímico para la Localización Subcelular de AO en las Células CEI.....	44
15. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control y Células CEI Bajo Condiciones Quimiostáticas.....	45
16.- Micrografías Electrónicas de Transmisión de las Células Control y de las Células CEI bajo Condiciones Quimiostáticas	47
17. Micrografías Electrónicas de Transmisión de esferoplastos de las Células Control y de las Células CEI bajo Condiciones Quimiostáticas	48

18.	Micrografía Electrónica de Transmisión de Células de <i>Hansenula polymorpha leu1-1</i> Incubadas en Presencia de 5 µg/mL de Peroxisomicina A1	50
19.	Técnica de Replicación en Placa para el Aislamiento de Células de <i>Hansenula polymorpha leu1-1</i> con Disfunción Peroxisomal	51
20.	Micrografías Electrónicas de Transmisión de Células CEII Obtenidas a las 4 y 12 hrs. de Cultivo en Metanol	52
21.	Micrografías Electrónicas de Transmisión de Células CEII Obtenidas de la Fase Estacionaria de Crecimiento en Metanol	53
22.	Cinética de Crecimiento Celular y Utilización de Metanol por las Células Control y Células CEII.	54
23.	Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control y Células CEII en Glucosa/Sulfato de Amonio	55
24.	Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control y Células CEII en Etanol/Sulfato de Amonio	55
25.	Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control y Células CEII en Glucosa/Metilamina	56
26.	Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control y Células CEII en Glicerol/ Sulfato de Amonio	56
27.	Micrografía Electrónica de Transmisión del Análisis Inmunocitoquímico para AO en las Células CEII	57
28.	Esquema de los Mecanismos Posibles de Disfunción Peroxisomal Inducida por Peroxisomicina A1 sobre Células de <i>Hansenula polymorpha</i>	61
29.	Esquema de la Compartimentalización y la Función de los Peroxisomas en el Metabolismo del Metanol en <i>Hansenula polymorpha</i>	64

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

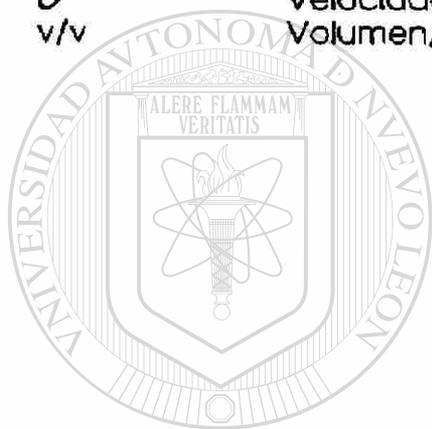


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Abreviaturas

5-FOA	Acido 5-fluoro orótico
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albúmina sérica bovina
AO	Alcohol oxidasa
PBS-glicina	Amortiguador de fosfatos glicina-salina
g	Aceleración de la gravedad aplicada para sedimentar una partícula dada
atm	Atmósfera
ΔA_{240}	Cambio de Absorbancia a 240 nm
CEI	Células experimentales tipo I
CEII	Células experimentales tipo II
Mut	Células deficientes en la utilización de metanol
WT	Células silvestres
CBS	Central Bureau voor Schimmelculturen
cm ³	Centímetro cúbico
cols.	Colaboradores
com.pers.	Comunicación personal
C	Carbono
CI	Compuestos con un átomo de carbono
DO ₆₆₀	Densidad óptica determinada a 660 nm
DHAS	Dihidroxiacetona sintasa
DL ₅₀	Dosis letal media
fg	Fentogramas
Fig.	Figura
GSH	Glutatión reducido
°C	Grados celsius
g	Gramo
hr.	Hora
hrs.	Horas
YPD	Medio con extracto de levadura, peptona y dextrosa
YND	Medio mineral, base nitrogenada y dextrosa
YNM	Medio mineral, base nitrogenada y metanol
YNMe	Medio mineral, base nitrogenada y metilamina
YNE	Medio mineral, base nitrogenada y etanol
µm	Micrómetro
µg	Microgramo
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
ME	Microscopio Electrónico
mg	Miligramo
mL	Mililitro

mm	Milímetro
mM	Millimolar
min.	Minutos
M	Molar
nm	Nanómetros
N	Nitrógeno
NADH	Dinucleótido de nicotina adenina reducido
NCYC	National Collection of Yeast Cultures Catalogue
p/v	Peso/volumen
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno (hidronio)
r.p.m.	Revoluciones por minuto
seg.	Segunda
t_d	Tiempo de generación
U	Unidad
D	Velocidad de dilución (hrs. ⁻¹)
v/v	Volumen/volumen



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Rigoberto Vargas Zapata

Fecha de graduación: Diciembre, 1998

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio:

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE CELULAS DE
LEVADURA CON DISFUNCION PEROXISOMAL
INDUCIDA POR LA PEROXISOMICINA A1

Número de páginas: 88

Candidato para el grado de Doctor
en Ciencias con especialidad en
Morfología

Area de Estudio: Morfología

Propósito y Método del Estudio: La peroxisomicina A1 es una antracenoína dimérica aislada de las plantas del género *Karwinskia*. Este compuesto es considerado como un potencial medicamento antineoplásico debido a que presenta toxicidad selectiva sobre células neoplásicas de origen humano derivadas de hígado, pulmón y colon. Los estudios encaminados a elucidar el mecanismo de acción de este compuesto, establecen que el peroxisoma es el organelo blanco de la peroxisomicina A1 en levaduras y en hígado de ratas y monos intoxicados experimentalmente. En este trabajo se presentan los métodos para aislar células de *Hansenula polymorpha* con disfunción peroxisomal, inducida por la peroxisomicina A1, con el propósito de contar con un modelo que permita obtener información sobre el mecanismo de la interacción peroxisomicina A1-peroxisoma. Se describen las características ultraestructurales, bioquímicas y fisiológicas de dos cepas con disfunción peroxisomal.

Conclusiones y Contribuciones: Las células aisladas presentaron las siguientes características: peroxisomas anormales en morfología y número, observándose una elevada tasa de recambio peroxisomal; actividad de alcohol oxidasa disminuida en un 50 %; biomasa en los cultivos líquidos con metanol significativamente disminuida y utilización deficiente del metanol. Estos resultados sugieren que la disfunción peroxisomal podría estar relacionada, en parte, con una posible alteración en la membrana peroxisomal caracterizada por la incapacidad para balancear de manera adecuada el flujo del formaldehído. Los resultados obtenidos demuestran que el daño selectivo e irreversible sobre la membrana peroxisomal, es un evento reproducible y además confirma que el peroxisoma es el organelo blanco de la peroxisomicina A1 en células de levadura. Las cepas con disfunción peroxisomal inducida por la peroxisomicina A1, aisladas y caracterizadas en este trabajo constituyen un organismo modelo para realizar diferentes estudios relacionados con la biogénesis y la función peroxisomal.

FIRMA DEL ASESOR INTERNO


M.C.P. y Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra

CAPITULO 1

INTRODUCCION

El género *Karwinskia* es un taxón perteneciente a la familia Rhamnaceae, constituido básicamente de arbustos y pequeños árboles, que incluye 15 especies cuyo hábitat natural se extiende desde el sur de los Estados Unidos de América a México, Centroamérica, norte de Colombia, Cuba, Haití y República Dominicana. México cuenta con 12 especies distintas, según Fernández Nava¹, y de éstas *Karwinskia humboldtiana* destaca por su extensión territorial.

El efecto paralítico producido por la ingestión accidental del fruto de la planta, es uno de los primeros datos toxicológicos referidos en la literatura y se remonta hacia fines del siglo XVIII, en la obra de Clavijero "Historia de la Antigua o Baja California"².

De esa fecha a nuestros días, se han realizado múltiples estudios sobre las manifestaciones clínicas que se presentan a consecuencia de la ingestión del fruto de *K. humboldtiana*^{3,4,5,6,7}, igualmente estudios enfocados a identificar a los órganos blanco del efecto tóxico de las sustancias de la planta^{6,7,8,9}, al aislamiento, purificación y caracterización de las sustancias responsables de dicho efecto, así como a la caracterización morfológica y funcional de la planta mantenida tanto en condiciones de invernadero como en cultivo *in vitro*¹⁰. En relación al aislamiento de las sustancias tóxicas, Dreyer y cols.¹¹ aislaron cuatro antracenas dimericas y las denominaron en

base a su peso molecular como: T 496, T 514, T 516 y T 544. Posteriormente, Waksman y cols.^{12,13} han aislado de las especies de *K. parvifolia*, *K. tehuacana* y *K. humboldtiana* otros compuestos antracenónicos como son: un diasteroisómero de la T 514 (Diast T 514), una T 510 y un isómero de la T 514 (iso T 514).

Bermúdez y cols.^{14,15} realizaron estudios de toxicidad aguda en ratones, tanto con fruto molido de *K. humboldtiana* como con las toxinas puras T 496, T 514 y T 544. Ellos demostraron que tanto el fruto, como las toxinas purificadas son marcadamente citotóxicos, y que causan daño hepatopulmonar grave. En estos estudios se estableció que la T 514 produce un efecto tóxico más marcado sobre el hígado, pulmón y riñón que la T 544, mientras esta es responsable del daño neurológico periférico. Aquellos animales que recibieron la T 514 purificada, desarrollaron necrosis centrolobulillar y esteatosis hepática, así como lesiones en el riñón y pulmón, sin presentar efectos neurológicos periféricos. Por otra parte con la T 496 solo observaron un marcado efecto catártico.

La determinación de la DL₅₀ para la T 514 en diferentes especies animales, mostró una curva dosis-respuesta con pendiente muy empinada¹⁶, lo que indica una variación biológica estrecha¹⁷. Los efectos citotóxicos aunados a lo abrupto de la pendiente de letalidad, permitieron plantear la hipótesis de que de haber toxicidad selectiva entre células de origen benigno y maligno, la T 514 podría tener un potencial efecto antineoplásico. Fue así como Piñeyro y cols.¹⁸ en estudios realizados *in vitro* en diferentes líneas celulares humanas, demostraron que la T 514 posee dicho efecto en células neoplásicas de pulmón, de colon y de hígado. Estos hallazgos han sido confirmados por investigadores de las Universidades de Berlín y Freiburg (Alemania) y recientemente en el Instituto Nacional de Cáncer (E.U.). Por lo anteriormente expuesto, puede considerarse a la T 514 como un potencial fármaco antineoplásico, del cual entre otras cosas, es

necesario obtener más información acerca de su mecanismo de acción.

En este particular, a partir de las observaciones de la infiltración grasa del hígado, se han realizado estudios histopatológicos que establecen que la T 514 causa una disminución marcada del número de peroxisomas en el hígado de ratas (Sepúlveda, S. J. y cols. 1998 Toxicology Letters; en prensa) y monos intoxicados experimentalmente (Piñeyra, A. y Sepúlveda, J. com. pers.). En dichos estudios se demostró que el número de peroxisomas disminuye a los pocos minutos de la administración de la T 514. Esto ha sugerido que el mecanismo de acción de la T 514 podría estar relacionado con la acción peroxisomal, ya que se sabe que algunos tumores malignos tienen un número escaso de este organelo indispensable para la vida celular¹⁹.

Sepúlveda y cols.²⁰ en estudios efectuados en levaduras metilotróficas, han demostrado que la T 514 afecta de manera selectiva e irreversible la integridad de la membrana de los peroxisomas de estas células. En cultivos de *Candida boidinii* así como de *Hansenula polymorpha* en presencia de dosis no letales de T 514, se observó una interrupción de la continuidad de la membrana peroxisomal. Observaron también por análisis inmunocitoquímico con anticuerpos específicos contra la enzima alcohol oxidasa (AO), conjugados con oro coloidal, a esta enzima peroxisomal dentro de la vacuola digestiva, lo que indica un proceso de autofagia de los peroxisomas dañados. En este mismo estudio se reportó, en contraste con lo encontrado *In vitro*²¹, que la actividad de dos de las enzimas peroxisomales, la catalasa y la AO no es afectada por la T 514.

Este efecto selectivo sobre la membrana peroxisomal sugiere que el peroxisoma sea el organelo blanco de la T 514, y debido a este hallazgo se renombró como peroxisomicina A1.

Estudios *In vitro* llevados a cabo por Moreno y cols.²¹ han establecido que la peroxisomicina A₁ (y otros compuestos antracénicos aislados y purificados de especies del género *Karwinskia*) produce inhibición de tipo no competitivo sobre la catalasa hepática de tres especies diferentes de animales. Posteriormente, Moreno y cols.²² realizaron estudios *in vivo* en ratones intoxicados con peroxisomicina A₁ y demostraron, tanto por métodos bioquímicos como histoquímicos, que la peroxisomicina A₁ no produce inhibición de la catalasa hepática. Un resultado similar se observó *in situ* al incubar fragmentos de tejido hepático de ratón en presencia de la toxina. Estos resultados demuestran que la peroxisomicina A₁ no inhibe la actividad de la catalasa en tejido hepático del ratón albino.

Hasta el momento, la información disponible acerca del mecanismo de acción de la peroxisomicina A₁ indica que el peroxisoma es el organelo blanco tanto en levaduras como en hígado de ratas y monos.

1.1 Peroxisomas

1.1.1 Introducción

Los peroxisomas son organelos que fueron descritos por primera vez a principios de los años 50 en células del túbulo contorneado de riñón de ratón por medio de microscopía electrónica, e inicialmente se les llamó microcuerpos, ya que no se les había asociado a ninguna actividad bioquímica^{23,24}. Posteriormente, De Duve y cols.²⁵ los llamaron peroxisomas al demostrar que en estos organelos se produce peróxido de hidrógeno. Esto ocurre al actuar un grupo de oxidasas (que utilizan el oxígeno molecular) sobre diversos substratos (vía respiratoria peroxisomal).

Los peroxisomas están distribuidos ampliamente en células eucariotas, las cuales se caracterizan por la compartimentalización de rutas y procesos bioquímicos²⁵.

1.1.2 Función

Las diversas funciones de estos organelos incluyen procesos de fotorespiración en las plantas²⁶, en el metabolismo del colesterol en mamíferos^{26,27}, biosíntesis de penicilina en hongos filamentosos²⁸, metabolismo de compuestos con un átomo de carbono (C1) en levaduras²⁹. El contenido enzimático de los peroxisomas puede variar según la especie y dentro de una misma especie, de tejido a tejido, en donde llevan a cabo tanto procesos oxidativos como biosintéticos. Las funciones más importantes de los peroxisomas en células eucariotas superiores son, entre otras: el metabolismo del peróxido de hidrógeno, la β -oxidación tanto de ácidos grasos de cadena larga (AGCL) como de ácidos grasos de cadena muy larga (AGCML), la biosíntesis de ácidos biliares y plasmalógenos, el catabolismo de purinas y algunas reacciones del metabolismo del colesterol²⁶.

1.1.3 Morfología

Los peroxisomas son de forma esférica o ligeramente elíptica con diámetro que varía desde 0.1 a 1 μm . Están rodeados por una sola membrana, cuyo grosor es más pequeño (7 nm) comparado con el de las membranas de otros organelos³⁰. La membrana rodea a una matriz electrodensa finamente granular. Estudios inmunocitoquímicos han revelado que las enzimas de la matriz no se distribuyen uniformemente, lo que sugiere que la matriz posee algún grado de organización estructural que además depende de la especie³¹. Por ejemplo, en los peroxisomas de hígado de rata los cristaloides consisten de urato oxidasa^{32,33}, y los de algunas levaduras metilotróficas consisten de AO³⁴. En otras especies, como en el hombre, los peroxisomas no presentan

cristales ya que carecen de esas enzimas. Los peroxisomas de células del túbulo contorneado proximal del riñón de especies como el conejo, contienen una estructura electrodensa, aplanada, localizada en la periferia del organelo adyacente a la membrana, y recibe el nombre de placa marginal; se desconoce su composición bioquímica³⁵.

1.1.4 Aislamiento y Propiedades Físicas

El método más utilizado para la obtención de la fracción peroxisomal combina dos tipos de técnicas: la centrifugación diferencial clásica, técnica rápida y sencilla para la separación de diferentes fracciones a partir de un homogeneizado y la sedimentación en equilibrio zonal, que permite la separación más eficiente de partículas de acuerdo a su coeficiente de sedimentación, densidad y forma³⁶. Para esta última técnica se utilizan gradientes de un determinado soluto, los más utilizados son: la sacarosa, metrizamida, Nicodenz y el Percoll³⁷. Las propiedades físicas de los peroxisomas que han sido establecidas bajo diferentes condiciones son: 1) peso seco promedio de 24 fg (24×10^{-15} g), 2) densidad (en seco) promedio de 1.32 g/cm^3 y 3) coeficiente de sedimentación (en sacarosa 0.25 M) de 4,400 S²⁵.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

1.1.5 Biogénesis

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Actualmente existe un consenso general de que estos organelos se originan por fisión de peroxisomas preexistentes en la célula (fig. 1). Debido a que estos organelos no contienen su propio ADN, todas las proteínas peroxisomales tanto de matriz como de membrana, son sintetizadas en ribosomas libres del citoplasma y enseguida son incorporadas post-traduccionalmente hacia los peroxisomas ya existentes³⁸.

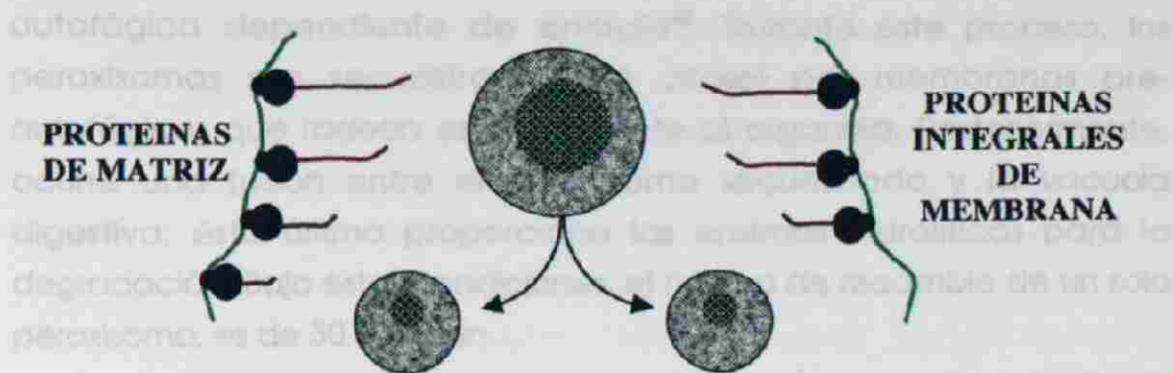


Figura 1. Modelo de Biogénesis Peroxisomal (Lazarow and Fujiki, 1985).

1.1.6 Recambio y Degradación Peroxisomal

La autofagia -como una forma de degradación y recambio de componentes intracelulares- es un fenómeno general en las células eucariotas, bajo condiciones fisiológicas normales, pero es especialmente evidente en células bajo condiciones de estrés³⁹. Hasta el momento, se cree que los peroxisomas son destruidos de manera aleatoria por autofagia, ya que han sido observados dentro de autofagosomas, en mamíferos, y en vacuolas autofágicas, en levaduras^{35,40}. Los peroxisomas de los hepatocitos tienen una vida media de aproximadamente 4 días⁴¹, y el tiempo de degradación es aproximadamente de 4 min., lo que es considerablemente más corto, comparado con el tiempo de degradación de las mitocondrias (16 min.).

El proceso de degradación peroxisomal en levaduras ha sido ampliamente estudiado en *Hansenula polymorpha*. Durante la fase de crecimiento exponencial de este organismo el proceso de autofagia no es común. Sin embargo, al cambiar las células bajo condiciones de inducción de peroxisomas a condiciones no inducidas, los peroxisomas son rápidamente degradados por un proceso de degradación

autofágica dependiente de energía⁴⁰. Durante este proceso, los peroxisomas son secuestrados del citosol por membranas pre-autofágicas que rodean estrechamente al organelo. Posteriormente, ocurre una fusión entre el peroxisoma secuestrado y la vacuola digestiva; ésta última proporciona las enzimas hidrolíticas para la degradación. Bajo estas condiciones, el tiempo de recambio de un solo peroxisoma, es de 30 a 45 min.

1.1.7 Enfermedades Peroxisomales

En el humano, existen enfermedades genéticas que involucran a los peroxisomas. Este grupo de enfermedades hereditarias se denominan enfermedades peroxisomales, y dependiendo de los trastornos clínicos y bioquímicos que producen se pueden dividir en desórdenes que se caracterizan por i) defectos en la biogénesis peroxisomal y ii) aquellos en los que los peroxisomas se encuentran presentes e intactos pero son deficientes en una o más funciones peroxisomales^{42,43}. El primer grupo está compuesto de varios síndromes cuya característica fundamental es la ausencia total de peroxisomas (Síndrome de Zellweger o síndrome cerebro-hepato-renal y la enfermedad infantil de Refsum, entre otros); o la disminución marcada en el tamaño y número de los peroxisomas en células del hígado y riñón (Adrenoleucodistrofia neonatal). En el segundo grupo se encuentran enfermedades relacionadas con defectos enzimáticos específicos (Adrenoleucodistrofia ligada a X, Acatasemia, entre otras). De todas, la mejor estudiada y caracterizada es el síndrome de Zellweger. Los pacientes afectados, generalmente mueren durante las primeras semanas o meses después del nacimiento. Los peroxisomas no son detectables por microscopía electrónica. Las anomalías bioquímicas que acompañan a la ausencia de peroxisomas incluyen entre otras: acumulación de AGCML, disminución de los niveles de plasmalógenos y aumento en los niveles de ácido pipercolico.

A raíz del descubrimiento de las enfermedades peroxisomales, se ha intensificado la búsqueda de un organismo modelo que aporte información valiosa sobre la función y biogénesis peroxisomal. Las células de levadura constituyen tal modelo para dichos estudios debido a que combinan una serie de ventajas, entre las que se incluyen: facilidad para obtener grandes cantidades de biomasa en substratos económicos (metanol), capacidad de inducir la proliferación peroxisomal y composición proteica bajo condiciones de cultivo en substratos específicos⁴⁴ y la accesibilidad para desarrollar estudios de genética clásica y molecular⁴⁵.

1.2 *Hansenula polymorpha*

1.2.1 Inducción Peroxisomal

Hansenula polymorpha, una levadura ascosporogénica metilotrófica (utiliza el metanol como fuente de carbono y energía), es uno de los organismos más utilizados en la actualidad para el estudio de la función y biogénesis peroxisomal.

En base al amplio conocimiento sobre las condiciones de cultivo de *H. polymorpha*, se han logrado establecer en forma precisa las mejores condiciones para la obtención del máximo nivel de inducción peroxisomal, así como la inducción de enzimas específicas^{46,47,48}. La tabla 1 muestra el análisis morfométrico de peroxisomas en *H. polymorpha*, bajo diferentes condiciones de cultivo.

TABLA I

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO (NÚMERO Y FRACCIÓN DE VOLUMEN) DE PEROXISOMAS EN *Hansenula polymorpha* EN RELACION A LAS CONDICIONES DE CULTIVO.

Cultivos líquidos				
Fuente de C	Fuente de N	Número de peroxisomas promedio	Fracción de volumen peroxisomal	
glucosa	sulfato de amonio	0.05	0.10	
etanol	sulfato de amonio	0.20	1.00	
glicerol	sulfato de amonio	0.70	8.10	
metanol	sulfato de amonio	0.90	19.90	
glucosa	metilamina	0.40	2.30	
Cultivo Quimioestático				
Fuente de C	Fuente de N	D	Número de peroxisomas promedio	Fracción de volumen peroxisomal
metanol	sulfato de amonio	0.16	2.56	34.10
metanol	sulfato de amonio	0.10	2.78	37.00
metanol	sulfato de amonio	0.03	2.61	48.40

El análisis morfométrico se lleva a cabo en cortes ultrafinos de células fijadas con KMnO_4 . El número de peroxisomas se expresa como el número de peroxisomas promedio por corte. Veenhuis y cols., 1990.

Para llevar a cabo estos estudios, las células se pre-cultivaron en medio con glucosa y posteriormente se incubaron en medios con diferentes fuentes de carbono y/o energía. Para los cultivos bajo condiciones quimioestáticas (metanol como sustrato limitante), las células previamente pre-cultivadas, se incubaron en 2 litros de medio con glucosa y se cultivaron hasta la fase estacionaria. Después se adicionó medio con metanol a diferentes velocidades de dilución (D): 320 mL/hr., 200 mL/hr. y 60 mL/hr.. La fracción de volumen o densidad de volumen peroxisomal (porcentaje del área peroxisomal en los cortes en relación al área total del citoplasma), se estimó por la técnica de conteo de puntos e intersecciones de Weibel y Bolender⁴⁶. Se demostró que bajo condiciones quimioestáticas, los peroxisomas pueden ocupar hasta el 80 % del volumen citoplasmático⁴⁶.

Otros sustratos que inducen proliferación peroxisomal en este organismo son el etanol, aminas primarias, D-aminoácidos y purinas^{44,47}.

Los peroxisomas juegan un papel fundamental durante el cultivo de las células bajo estas condiciones debido a que contienen las enzimas clave del metabolismo de esos sustratos. En la tabla 2 se muestran los diferentes sustratos de crecimiento que inducen la proliferación de peroxisomas y las enzimas inducidas.

TABLA 2

SUBSTRATOS QUE INDUCEN LA PROLIFERACION DE PEROXISOMAS Y ENZIMAS INDUCIDAS EN *Hansenula polymorpha*.

Substrato	Enzimas peroxisomales
Fuente de carbono	
etanol	isocitrato liasa malato sintasa
metanol	alcohol oxidasa dihidroxiacetona sintasa catalasa
Fuente de nitrógeno	
ácido úrico	urato oxidasa catalasa
(m)etilamina/colina	amino oxidasa catalasa
D-alanina/D-metionina	D-aminoácido oxidasa catalasa

Veenhuis, M. Yeast microbodies (1988). Tesis Doctoral, Universidad de Groningen, Holanda.

1.2.2 Análisis Molecular y Genético

Aunado a los estudios fisiológicos, bioquímicos y ultraestructurales, los estudios de genética clásica y molecular, han permitido la obtención de mucha información sobre la función y biogénesis peroxisomal en *H. polymorpha*. Algunas de las técnicas que han sido estandarizadas para este organismo incluyen: técnicas de transformación^{45,51}, técnicas para el aislamiento e identificación de mutantes; técnicas para el apareamiento, esporulación, análisis de esporas al azar, disección de tétradas y análisis de complementación⁵².

La disponibilidad de estas técnicas, además del amplio conocimiento sobre las características fisiológicas, bioquímicas y morfológicas de *H. polymorpha*, han contribuido a que se utilice esta levadura como modelo para el presente trabajo.

1.3 Antecedentes Experimentales

Sepúlveda y cols²⁰ demostraron que la peroxisomicina A1 afecta de manera selectiva e irreversible la integridad de la membrana peroxisomal de células de levadura. Después de Incubar las células en presencia de una dosis no letal de peroxisomicina A1, las células mostraron deficiencias en las funciones específicas peroxisomales, ya que el crecimiento en metanol cesó casi inmediatamente. A los 30 min., se observó daño sobre los peroxisomas, caracterizado por interrupción en la continuidad de su membrana; como consecuencia las proteínas de matriz se fugaron hacia el citosol. Estos resultados son de particular interés, debido a que, i) no se tienen reportes, hasta el momento, de compuestos que inducen efecto parecido, ii) el daño sobre la membrana peroxisomal, podría explicar la toxicidad selectiva *in vitro* de la peroxisomicina A1, sobre células neoplásicas¹⁷ ya que existen varios reportes de que algunas células malignas contienen menor número de peroxisomas¹⁹ y iii) los defectos en la función peroxisomal inducidos específicamente por la peroxisomicina A1, en células de levadura, representan un atractivo modelo experimental para el estudio de la biogénesis y función peroxisomal. En relación a esto último, es importante mencionar que existen varios grupos de investigación que han estado estudiando el impacto que pudiera tener el conocimiento de las deficiencias en la función peroxisomal en células de levadura, en analogía con las enfermedades peroxisomales, descritas anteriormente. Estos grupos de investigadores han combinado esfuerzos para aislar y caracterizar células de diferentes especies de levaduras (*S. cerevisiae*⁵³, *H. polymorpha*⁵⁴, *P. pastoris*⁵⁵), deficientes en peroxisomas, por medio de procedimientos de mutagénesis con *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-

nitrosoguanidina⁵⁵. Las cepas mutantes de *H. polymorpha* han sido obtenidas en base a la incapacidad que presentan las células para utilizar el metanol (células mutantes Mut⁻) como única fuente de carbono. Van der Klei y cols.⁵⁶ han establecido que la incapacidad de estas células para crecer en metanol se debe, principalmente, a la ausencia de la membrana peroxisomal intacta. Es decir, la presencia de peroxisomas intactos es esencial para el metabolismo eficiente del metanol.

La información disponible hasta este momento acerca del mecanismo de acción de la peroxisomicina A1 indica que el peroxisoma es el organelo blanco tanto en levaduras como en hígado de ratas y monos.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.4 Hipótesis de Trabajo y Objetivos

1.4.1 Hipótesis de Trabajo

“Si el daño producido por la peroxisomicina A₁ sobre la Integridad peroxisomal a una dosis no letal fuera irreversible, sería posible obtener células con disfunción peroxisomal”.

1.4.2 Objetivos Generales

1. Establecer las condiciones óptimas de cultivo para determinar la fase de crecimiento en la cual las células de levadura contengan un solo peroxisoma, para evaluar el efecto de la peroxisomicina A₁.
2. Incubar células con una dosis no letal de peroxisomicina A₁ y aislar las células incapaces de crecer en metanol.
3. Evaluar la función de los peroxisomas de las células aisladas.

1.4.3 Objetivos Específicos

1. Estudiar la cinética de crecimiento celular en medio de cultivo con metanol.
2. Analizar ultraestructuralmente a las células a diferentes tiempos de cultivo, para establecer el tiempo de inducción peroxisomal de interés para el estudio.
3. Incubar células con una dosis no letal de peroxisomicina A₁ en la fase de inducción establecida.
4. Aislar las células incapaces de crecer en metanol.
5. Evaluar la integridad de los peroxisomas de las células por microscopía electrónica y ensayos bioquímicos.

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

2.1 Material Biológico

Se utilizaron las siguientes cepas de levadura:

Hansenula polymorpha cepa CBS 4732

Hansenula polymorpha cepa NCYC leu 1-1

Hansenula polymorpha cepa NCYC ade11met6

La peroxisomicina A1 de *K. parvifolia* se aisló y purificó en el laboratorio de extracción del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

2.2 Equipo y Reactivos

Las sustancias se pesaron en balanzas analíticas Mettler P1200 y Mettler PJ360 DeltaRange. El pH de las soluciones y medios de cultivo se determinó en un pHmetro Hanna Instruments 8417. Los electrodos y las soluciones de calibración se obtuvieron de Beckman.

Los cultivos se realizaron en una incubadora New Brunswick Scientific con temperatura y agitación controlada, a 37°C y a 200 r.p.m., respectivamente. Las placas de agar se incubaron en una incubadora estática a 37°C.

La densidad óptica de los cultivos se determinó en un fotómetro Meyvis Vitatron MCP, y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm (DO_{660}). La concentración de metanol en el medio de cultivo se determinó por cromatografía de gases en un Cromatógrafo Hewlett Packard modelo 437.

Para la obtención de extracto libre de células, se utilizó una centrifuga Eppendorf 5415C. La actividad enzimática de AO (EC 1.1.3.13) y la de catalasa (EC 1.11.1.6) se determinó en un espectrofotómetro Hitachi modelo 100-60. Se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm de paso de luz y de 3 mL de volumen.

Las soluciones para procesar las muestras para microscopía electrónica de transmisión (MET) se prepararon dentro de una campana de extracción. Las muestras se deshidrataron en un horno de microondas Bio-rad H2500. Los cortes finos se obtuvieron en un ultramicrotomo LKB Ultratome III tipo 8802A, con cuchilla de diamante (DIATOME). Los cortes se montaron en rejillas de cobre y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión (ME) Phillips EM300.

La resina epóxica se obtuvo de Serva Boehringer y la resina acrílica (Lowicryl-K4M) de Polysciences Ltd. Los anticuerpos policlonales anti-AO se obtuvieron de conejos inmunizados en el laboratorio de Inmunología de la Universidad de Groningen y los conjugados de oro coloidal de Amersham.

2.3 Método de Cultivo

2.3.1 Cultivo Primario y Pre-cultivo

Para el cultivo primario, se tomó una colonia de células de *Hansenula polymorpha* cepa CBS 4732 aislada de una placa de agar YPD (ver apéndice A), se inoculó en 200 mL de YPD líquido, y se cultivó

durante 16 hrs. El pre-cultivo se realizó de la manera siguiente: se transfirió una alícuota del cultivo primario a un matraz con 100 mL de YND y se determinó la DO_{660} para iniciar el cultivo con una masa celular inicial equivalente a 0.1 DO_{660} /mL de cultivo. Después de 6 hrs. de cultivo (DO_{660} de 1.0/mL, que corresponde a la fase de crecimiento exponencial media), se transfirió una alícuota de este cultivo con una DO_{660} de 0.1/mL a un matraz con 100 mL de YND y se incubó hasta la fase de crecimiento exponencial. Este procedimiento se repitió una vez más para obtener el pre-cultivo. Independientemente de los sustratos utilizados, todos los cultivos líquidos (no quimioestáticos), se iniciaron con una DO_{660} de 0.1/mL.

2.3.2 Cultivos bajo Condiciones de Inducción de la Proliferación de Peroxisomas

Para la inducción de la proliferación de peroxisomas, las células previamente pre-cultivadas en glucosa se transfirieron a uno de los siguientes medios inductores: YNM, YNMe, YNE, para realizar cultivos líquidos.

Debido a que el crecimiento de las células en cultivos líquidos no se encuentra completamente en condiciones de equilibrio, se realizaron cultivos quimioestáticos.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En el cultivo quimioestático la energía y la materia son transformadas continuamente y todos los parámetros físicos, químicos y matemáticos que definen el contenido del fermentador se mantienen constantes durante cada estado de equilibrio. Entre estos parámetros se incluyen la energía y entropía, la concentración de sustratos en el medio y la biomasa, la composición y concentración de biomasa, el número, tamaño y edad de las células, así como el tiempo de generación celular. El estado de equilibrio puede perderse al cambiar la composición del medio, la velocidad de dilución (D) o la temperatura. Cualquier cambio en las condiciones de cultivo provoca la pérdida del

estado de equilibrio. En respuesta, las células tienden a adaptarse a esos cambios y establecen un nuevo estado de equilibrio. Este último se alcanza después de un tiempo durante el cual las células se encuentran en una etapa denominada estado de transición.

En el cultivo quimiostático, se puede mantener a las células en condiciones lo más parecido a su hábitat natural y se puede evaluar su comportamiento bajo condiciones en las cuales el sustrato se administra en forma continua y limitada, obteniéndose la máxima inducción de proliferación de peroxisomas. En estas condiciones los peroxisomas pueden ocupar hasta un 80 % del volumen citoplasmático.

Para realizar el cultivo quimiostático, una alícuota de células pre-cultivadas en YND se transfirió al reservorio del fermentador con 2 litros de MM. Se adicionó YND (con glucosa al 0.25 %, como sustrato limitante), a una velocidad de dilución de 200 mL/min. ($D = 0.1 \text{ hrs.}^{-1}$). Las células se incubaron hasta el estado de equilibrio y enseguida se adicionó una mezcla de YND/YNM (YND con glucosa al 0.25 % y YNM con metanol al 0.30 %; el metanol se utilizó como un segundo sustrato).

2.3.3 Determinación de la Fase de Crecimiento Óptima de *H. polymorpha* para el Estudio del Efecto de la Peroxisomicina A₁ [®]

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Para estudiar el efecto de la peroxisomicina A₁, se determinó la fase de crecimiento en la cual las células presentaron solamente un peroxisoma. Se tomaron alícuotas de células previamente pre-cultivadas y se incubaron en varios matraces con 100 mL de YNM. Los cultivos se agitaron y se obtuvieron muestras de estos cultivos a las 2, 4, 6 y 8 hrs. para el análisis ultraestructural por MET y hasta las 24 hrs. para el análisis de la cinética de crecimiento celular.

2.3.3.1 Evaluación de la Fase de Crecimiento Óptimo.

2.3.3.1.1 Análisis Ultraestructural. Las muestras para MET se fijaron en KMnO_4 al 1.5 %, se contrastaron en bloque con acetato de uranilo al 1 % por 1 hr. y se deshidrataron en una serie graduada de etanol al 50, 70, 96 y 100 % en un horno de microondas. Las muestras deshidratadas se procesaron hasta su inclusión en resinas epóxicas (ver apéndice B). Se obtuvieron cortes finos y se observaron en el ME para evaluar la ultraestructura de las células.

2.3.3.1.2 Análisis de la Cinética de Crecimiento Celular. Para analizar la cinética de crecimiento celular, se midió la DO_{660} de las muestras obtenidas a diferentes tiempos de cultivo. Los valores de DO_{660} y tiempo se almacenaron en el programa de computadora Microsoft Excel 5.0 para Macintosh. Se elaboraron curvas para evaluar la cinética de crecimiento de las células en medio de cultivo con metanol (ver apéndice A).

2.3.4 Estudio del Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre Células de *H. polymorpha*

2.3.4.1 Cultivos con una Dosis no letal de Peroxisomicina A1

Para realizar estos experimentos se tomó como referencia el trabajo publicado por Sepúlveda y cols.¹⁹ en el que se demostró que la supervivencia de las células de levadura es afectada de manera drástica, al incubar las células en presencia de una dosis de peroxisomicina A1 de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y mayores (20 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Con dosis menores, se observó una supervivencia del 60 al 90 %. Por lo anterior, en el presente trabajo se utilizó una dosis de peroxisomicina A1 de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Se inoculó una alícuota de células pre-cultivadas de *H. polymorpha* en 100 mL de YNM a una DO_{660} inicial de 0.1/mL y se cultivaron durante 6-7 hrs. Después de este tiempo las células se

centrifugaron, se eliminó el sobrenadante, se lavaron con MM sin sustrato y se resuspendieron en el mismo medio a una DO_{660} 1.0/mL. Se obtuvo una muestra del cultivo como control (sin peroxisomicina A1) y el resto de las células se incubaron en presencia de 5 μ g/mL de peroxisomicina A1 (cultivo problema). Se obtuvieron dos muestras del cultivo problema a los 60 y 120 min.

2.3.4.2 Evaluación del Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre los Peroxisomas de *Hansenula polymorpha*.

Se obtuvieron muestras del cultivo control sin toxina y del cultivo problema y se procesaron para MET. Se analizó la ultraestructura de las células para evaluar el efecto producido por la toxina sobre los peroxisomas.

Simultáneamente, las muestras del cultivo control y cultivo problema se diluyeron en MM y se sembraron en 10 placas de agar con metanol (agar YNM) y 10 placas de agar con glucosa (agar YND). Las placas se incubaron a 37°C durante 3-5 días. Transcurrido ese tiempo, se analizó la capacidad de las células que estuvieron en presencia de peroxisomicina A1, para crecer en esos sustratos (glucosa o metanol).

2.3.5 Aislamiento de Células con Disfunción Peroxisomal. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Para aislar células con disfunción peroxisomal, se tomaron como referencia los hallazgos obtenidos por van der Klei y cols.⁵⁶. En ellos se establece que la presencia de peroxisomas intactos son esenciales para el metabolismo eficiente del metanol. Lo anterior sugiere que si se dañara al único peroxisoma presente en la célula, podría tener severas consecuencias sobre la capacidad de las células para crecer en metanol.

Las células incapaces de crecer en metanol se aislaron por medio de la técnica de replicación en placas de agar. Esta consiste en la

transferencia de colonias perfectamente separadas unas de otras de una placa de agar a otra por medio de una felpa que se coloca sobre un soporte. Esta técnica permite evaluar simultáneamente el crecimiento de las mismas colonias en diferentes substratos ya que se conoce la posición exacta de cada una de ellas.

Las muestras control sin toxina y las muestras de los cultivos problema obtenidas a los 60 y 120 min. se diluyeron para obtener entre 100-500 colonias por placa. Las diluciones se realizaron de acuerdo al siguiente cálculo: una alícuota de un cultivo de *H polymorpha* con una DO_{660} de 0.1/mL contiene aproximadamente 1.4×10^7 células/mL. Se realizaron tres diluciones diferentes y de cada dilución se sembró 0.1 mL por placa de agar. Se sembraron 20 placas de agar YND y 20 de agar YNM.

Las placas se incubaron durante 2-3 días a 37°C y las colonias formadas en las placas YND se replicaron en agar YNM. Estas últimas placas se incubaron junto con las placas YND originales. Después de 3 a 5 días de cultivo, se revisaron las colonias en las placas de agar YND y se cotejaron con las colonias en las placas de agar YNM para identificar colonias incapaces para crecer en metanol. Estas colonias se seleccionaron de las colonias correspondientes en las placas con glucosa y se aislaron para evaluar si efectivamente presentaban incapacidad para crecer en metanol. Las colonias incapaces para crecer en metanol se seleccionaron y se aislaron para su caracterización.

EL procedimiento descrito anteriormente se realizó con la finalidad de aislar células incapaces de crecer eficientemente en metanol, comparadas con las células control sin toxina y se consideró que podrían representar células con probable disfunción peroxisomal. Para una identificación adecuada, estas células se denominaron como células experimentales tipo I (células CEI).

2.4 Evaluación de la Función Peroxisomal en las Células CEI

Para evaluar la función de los peroxisomas de las células CEI, se realizaron los siguientes análisis:

- Ultraestructural
- Fisiológico
- Bioquímico
- Citoquímico e Inmunocitoquímico
- Ultraestructural, Bioquímico e Inmunocitoquímico bajo Condiciones Quimiostáticas.

En todos los casos, las células se pre-cultivaron y posteriormente se transfirieron a medios de cultivo bajo condiciones de inducción peroxisomal. En algunos casos las células se cultivaron en medio YND (no inductor peroxisomal).

2.4.1 Análisis Ultraestructural

Se analizaron por microscopía electrónica las diferencias ultraestructurales de los peroxisomas de las células CEI y las células control durante la adaptación al cambio de un medio no inductor de peroxisomas a un medio inductor. Principalmente se hizo énfasis en la morfología (tamaño, forma, e integridad de la membrana) y número de peroxisomas.

Se pre-cultivaron células control y células CEI en YND y posteriormente se transfirió una alícuota de estas células a medio YNM líquido. Los cultivos se iniciaron con una DO_{660} de 0.1/mL. Se obtuvieron muestras de ambos cultivos a las 4, 8, 12, 24 y 48 hrs. y se procesaron para MET.

2.4.2 Análisis Fisiológico

Para el análisis fisiológico se realizaron cultivos líquidos en medios selectivos para evaluar la capacidad de las células para utilizar sustratos que requieren la presencia de enzimas peroxisomales.

2.4.2.1 Análisis de la Capacidad de Utilización de Metanol.

Se transfirieron células control y células CEI pre-cultivadas, a un medio YNM líquido, se obtuvieron muestras a diferentes tiempos de cultivo y se midió la DO_{660} . Simultáneamente, se determinó la concentración de metanol en el medio de cultivo por cromatografía de gases. Se obtuvo una alícuota de 2 mL, se colocó en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 10,000 r.p.m. durante 5 min. Se tomó del sobrenadante un volumen de 1.8 a 1.5 mL y se sometió a centrifugación durante 15 min. a 10,000 r.p.m.. Posteriormente se tomó del sobrenadante de 1.4 a 1.5 mL y se mantuvo a 4°C hasta su análisis. Para la cuantificación de la concentración de metanol se utilizaron las siguientes soluciones estándar de metanol (v/v): 0.50 %, (125 mM), 0.40 % (100 mM), 0.30 % (75 mM), 0.20 % (50 mM), 0.10 % (25.00 mM) y 0.05 % (12.50 mM).

Se graficaron los valores de DO_{660} , tiempo de cultivo y concentración de metanol para la obtención de curvas. Por medio de las curvas se evaluó la cinética de crecimiento celular y la capacidad de las células para utilizar el metanol como única fuente de carbono y energía.

2.4.2.2 Análisis de la Capacidad de Utilización de Glucosa, Etanol, Metilamina y Glicerol.

Se efectuaron los procedimientos ya descritos en la sección 2.4.2.1, excepto que las células pre-cultivadas se incubaron en los siguientes medios de cultivo: YND, YNE, YNMe y YNG.

2.4.3 Análisis Bioquímico

Para evaluar parcialmente la función bioquímica peroxisomal se determinó, en extracto libre de células, la actividad enzimática de dos enzimas peroxisomales: AO y catalasa.

Para la obtención del extracto libre de células, se realizaron cultivos de células control y células CEI, bajo condiciones de inducción peroxisomal (en medio YNM líquido). Se obtuvo un volumen de cultivo con una densidad equivalente a 75 unidades de DO_{600}/mL , se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 mL de amortiguador de fosfatos 40 mM, pH 7.0, se colocó en un tubo Eppendorf y las células se sometieron a lisis con perlas de vidrio (de 0.5 mm diámetro, prelavadas con ácido), por agitación en un vortex a máxima velocidad por 7 veces durante 45 seg. La suspensión se mantuvo a 4°C durante 1 min. entre cada agitación. Para separar los restos celulares se centrifugó por 20 min. a 15,000g. Posteriormente se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford⁵⁷. La actividad de AO se determinó por el método de Verduyn y cols.⁵⁸ y la actividad de catalasa por el método de Lück⁵⁹.

2.4.4 Análisis Citoquímico e Inmunocitoquímico

Para evaluar la actividad y localización sub-celular de la enzima AO, en las células CEI se obtuvieron esferoplastos y se analizaron por métodos citoquímicos e inmunocitoquímicos.

2.4.4.1 Obtención de Esferoplastos.

La obtención de esferoplastos se llevó a cabo a partir de una alícuota del cultivo con una densidad equivalente a 20 unidades de DO_{600}/mL . Las células se incubaron con β -mercaptoetanol 0.2 M en sorbitol 3 M (amortiguador A; ver apéndice B) durante 10 min. a temperatura ambiente y se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron en amortiguador de sorbitol 3 M, se centrifugaron,

el botón celular se resuspendió en amortiguador de sorbitol 3 M adicionado con 1 mg/mL de zimoliasa (amortiguador B) y las células se incubaron a 37°C durante 30 a 60 min. Se observó al microscopio de luz la formación de esferoplastos y el proceso se detuvo al colocar la suspensión en hielo.

2.4.4.2 Análisis Citoquímico: Método del Tricloruro de Cesio (Veenhuis y cols 1976).

Para el análisis citoquímico los esferoplastos se fijaron en glutaraldehído al 0.1 % en solución de cacodilato de sodio 0.1M (solución C; ver apéndice B), se lavaron con amortiguador de sorbitol 3 M y se resuspendieron en glutaraldehído al 6 % en solución C, se lavaron con amortiguador Tris-HCl a pH 8, y se incubaron con tricloruro de cesio ($CeCl_3$) 5 mM en presencia de 50 mM de aminotriazol. Posteriormente se lavaron y se incubaron en un volumen de la misma solución adicionada con 50 mM de metanol, a 37°C durante 2 hrs. Se cambió el medio cada hora y la solución se oxigenó. Los esferoplastos se lavaron con solución C a pH 6, y se fijaron en glutaraldehído al 6 % en solución D. Se post-fijaron con mezclas de tetraóxido de osmio al 0.5 % y dicromato de potasio al 2.5 % en solución D y se deshidrataron e incluyeron por el método descrito para MET.

2.4.4.3 Análisis Inmuncitoquímico: Método de la Proteína A-oro Coloidal (Slot y Geuze 1984).

Los esferoplastos se fijaron en glutaraldehído al 3 % en solución C, se lavaron con $NaIO_4$ al 0.1 % y en seguida con NH_4Cl al 1 %, se resuspendieron en alcohol al 50 % y se centrifugaron por 15 min.. Para la pre-inclusión las muestras se colocaron en soluciones de N,N dimetilformamida (DMF) al 50, 75 y 100 % en etanol al 50 %, y luego en mezclas de DMF:Lowicryl-K4M y la inclusión se realizó en Lowicryl-K4M. La polimerización de la resina se efectuó bajo luz ultravioleta. Se obtuvieron cortes finos y se montaron en rejillas de níquel con soporte de Formvar. Se bloquearon los sitios de unión inespecífica con albúmina sérica

bovina (BSA) y los cortes se incubaron con anticuerpos específicos anti-AO, se lavaron en amortiguador PBS-glicina, después se incubaron con la proteína A-conjugada con partículas de oro coloidal de 15 nm de diámetro, se lavaron y se contrastaron con acetato de uranilo al 1 %.

2.4.5 Análisis Ultraestructural, Bioquímico y Citoquímico e Inmunocitoquímico bajo Condiciones Quimiostáticas.

Para caracterizar a las células CEI bajo condiciones de máxima inducción peroxisomal, se incubaron en un cultivo quimiostático (ver sección 2.3.2)

Se obtuvieron muestras de este cultivo para realizar los siguientes análisis:

- Ultraestructural de las células completas y de esferoplastos
- Citoquímico e inmunocitoquímico de esferoplastos

Simultáneamente se realizó la determinación de la actividad de las enzimas AO y catalasa en extracto libre de células y la determinación de la concentración de glucosa y de metanol residual en el medio de cultivo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

2.5 Aislamiento y Caracterización de Células de *H. polymorpha leu1-1*®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Para contar con un modelo biológico eucariote que presente disfunción peroxisomal inducida por la peroxisomicina A₁ y que permita caracterizar a nivel molecular el mecanismo de la interacción toxina-peroxisoma, se realizó la misma estrategia experimental establecida en las secciones de la 2.3.4 a la 2.5, excepto que se utilizaron células de *H. polymorpha* con un marcador auxotrófico (*leu 1-1*). Las células que presentaron disfunción peroxisomal después de la evaluación morfológica, bioquímica y funcional, se denominaron células experimentales tipo II (células CEII) para diferenciarlas de las células CEI.

2.5.1 Análisis Genético

Para valorar si la disfunción peroxisomal que presentaban las células CEI y las células CEII se debía a un defecto genético, se realizaron experimentos de apareamiento, complementación y análisis de esporas al azar.

Para identificar a las diferentes cepas de *H. polymorpha* que se utilizaron en estos ensayos, se estableció la siguiente nomenclatura:

WT = células silvestres, normales prototróficas (no requieren la presencia de aminoácidos específicos).

leu1-1 = células mutantes con marcador auxotrófico *leu1-1* (requieren la presencia de L-leucina).

ade11met6 = células mutantes con doble marcador auxotrófica (requieren de adenina y L-metionina).

ura⁻ = células mutantes que requieren de uracilo.

Mut⁻ = células deficientes en la utilización del metanol

2.5.1.1 Obtención de Células CEI con Marcador Auxotrófico *ura⁻*.

Para llevar a cabo los experimentos de complementación, en un principio se intentó introducir un marcador auxotrófico a las células CEI por medio de cruza entre estas células y células de *H. polymorpha* con marcadores auxotróficos (*ade11met6*). Sin embargo, no se obtuvieron híbridos después de varios intentos. Por lo tanto, se decidió introducir un marcador auxotrófico (*ura⁻*) a las células CEI por medio de la selección de colonias resistentes al ácido 5-fluoro uracilo⁴² (5-FOA: análogo de pirimidina), por medio del siguiente procedimiento: una colonia de células CEI se incubó durante 16 hrs. en YPD líquido. Se obtuvo un volumen de 10 mL del cultivo con una densidad equivalente a 2 unidades de DO₆₀₀/mL (equivalente a una población de 10⁸ células/mL), las células se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante, el botón celular

se resuspendió en 1 mL de YPD líquido y las células se sembraron por extensión en agar YND adicionado con 500 µg/mL de 5-FOA y 50 µg/mL de uracilo. Las placas se incubaron a 37°C. Una vez que las colonias se formaron, se replicaron en placas de agar YND con y sin uracilo (medio selectivo) y se seleccionó a las colonias que presentaron el fenotipo deseado; colonias *ura⁻* y además deficientes en el crecimiento en metanol, es decir *Mut⁻ura⁻*.

2.5.1.2 Ensayos de Complementación.

Las células CEI *Mut⁻ura⁻* y las células CEII *Mut⁻leu1-1* se cruzaron entre sí y a su vez con sus respectivas cepas isogénicas que contenían los marcadores complementarios, es decir *ura⁻* y *leu1-1*. Para la obtención de células diploides (CEI:CEII), se sembraron 5 colonias de células CEI en forma de estrías sobre una placa de agar YPD y ésta se replicó sobre una placa de agar EM que contenía colonias de células CEII. Esta placa se incubó por 3 días y después se replicó sobre una placa de agar YND sin marcadores (no se adicionó uracilo ni leucina). Esta última placa se incubó por 3 días y enseguida se replicó sobre una placa de agar YNM sin marcadores. Después de la obtención de células diploides CEI:CEII, se analizó la capacidad de las mismas para crecer en metanol y se sometieron a un análisis de esporas al azar.

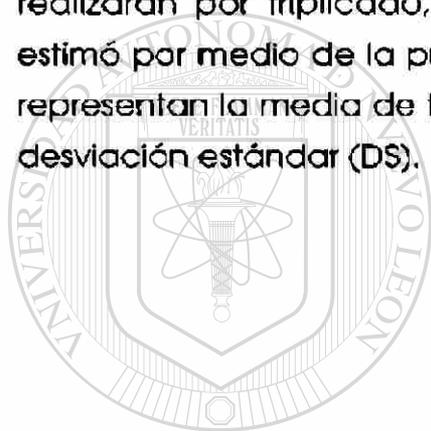
2.5.1.3 Análisis de Esporas al Azar.

Para establecer el ligamiento entre los probables genes afectados de ambas cepas, las células diploides CEI:CEII se sembraron en agar EM en forma de estrías, se incubaron por 3 días, se suspendieron en 10 mL de agua, se obtuvo un volumen de 0.9 mL de esta suspensión y se agregó 0.1 mL de dietil éter. La suspensión de células se incubó por 20 min. a temperatura ambiente bajo agitación, se realizaron tres diluciones diferentes para obtener 10, 100 y 500 colonias por placa. Las diluciones se sembraron en placas de agar YPD y se incubaron durante 4 días a

40°C. Estas placas se replicaron en placas de agar YNM y placas de agar YND (con y sin marcadores) y se incubaron por 3 días. Para el análisis del fenotipo de la progenie se contaron 100 colonias y se determinó su naturaleza prototrófica o auxotrófica y la capacidad de crecimiento en metanol o glucosa, tanto en presencia como en ausencia de marcadores selectivos.

2.6 Análisis Estadístico

En los experimentos que por su naturaleza, fue posible que se realizaran por triplicado, la significancia estadística de los datos se estimó por medio de la prueba t de Student. Los valores en las gráficas representan la media de tres determinaciones y la barra representa \pm la desviación estándar (DS).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Evaluación de las Condiciones Optimas de Cultivo

3.1.1 Análisis Ultraestructural

La figura 2 muestra los cambios ultraestructurales que presentaron las células de *Hansenula polymorpha*, después de transferirlas de un medio con glucosa a un medio con metanol como única fuente de carbono.

Durante la fase de crecimiento media exponencial en glucosa, las células contenían generalmente un sólo peroxisoma pequeño de forma irregular, con matriz homogénea sin inclusiones cristalinas y localizado muy cerca de la pared celular. Con frecuencia el peroxisoma se observó muy próximo a cisternas del retículo endoplásmico (figura 2A). Durante la fase de crecimiento estacionaria, la forma del peroxisoma cambió de esférica a cúbica

Las células en la fase de crecimiento media exponencial en glucosa, se incubaron en medio con metanol y se observó aumento en el tamaño y número de peroxisomas con respecto al tiempo de cultivo (figura 2B-E). Después de 2 hrs. de cultivo en metanol, el tamaño del peroxisoma incrementó gradualmente. Se observaron dos estados subsecuentes de crecimiento del peroxisoma a las 6 y a las 8 hrs. Además del crecimiento del peroxisoma, ocasionalmente se observó más de un peroxisoma por célula, generalmente de 2 a 3. La figura 2F muestra el arreglo cristalolde de la AO 2 hrs. después de la transferencia de las células al medio con metanol.

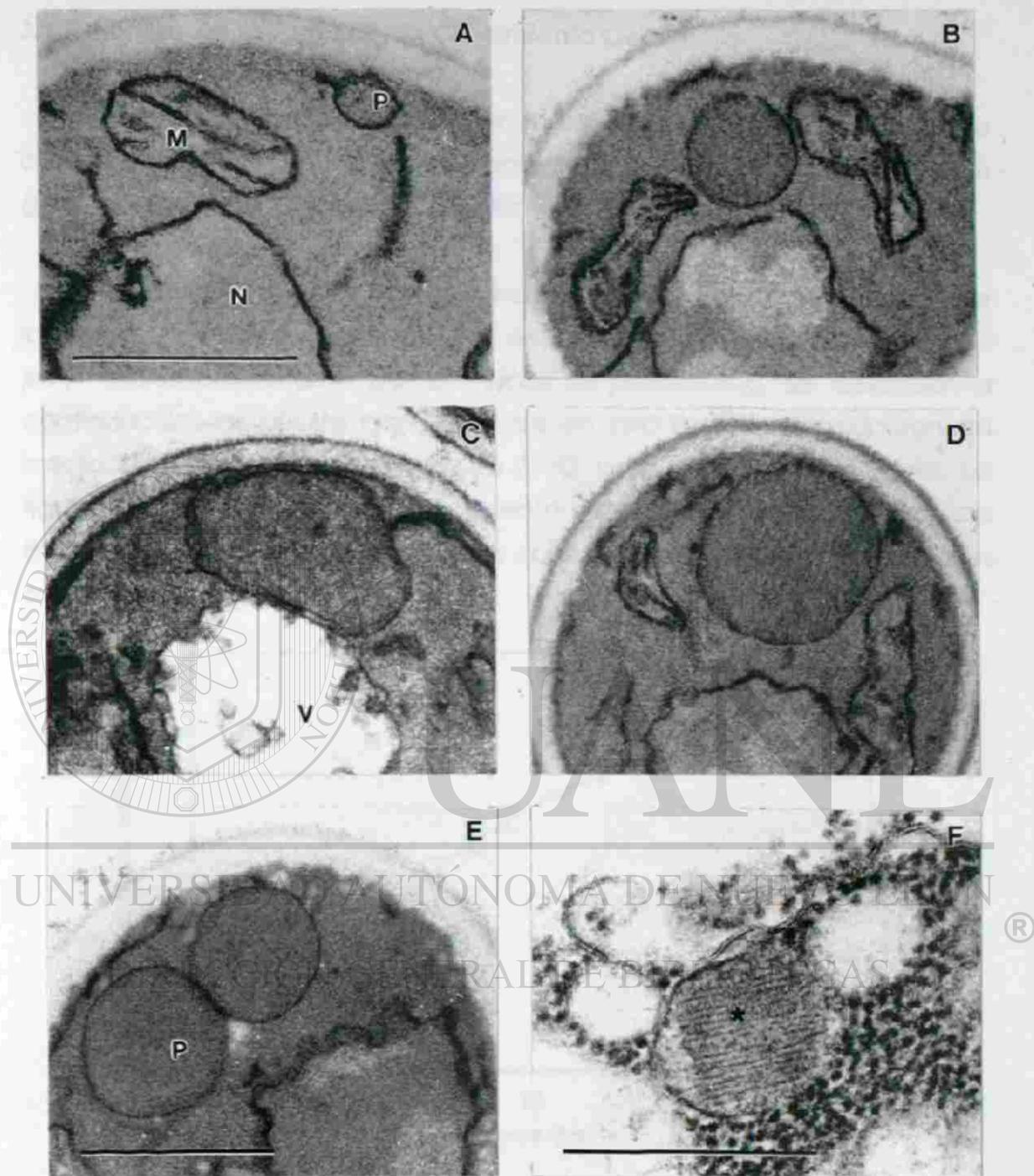


Figura 2. Micrografías Electrónicas de Transmisión de Células de *H. polymorpha* Durante el Crecimiento en Diferentes Condiciones. A) célula obtenida de la fase de crecimiento exponencial en glucosa 0.5 %. B, C, D, E y F) células obtenidas a las 2, 4, 6 y 8 hrs. de cultivo en metanol 0.5 %. F) esferoplastos preparados de células obtenidas a las 2 hrs. en metanol, que muestran el arreglo cristalinoide (*), de la AO dentro de un peroxisoma. Abreviaturas: N, núcleo; M, mitocondria; P, peroxisoma; V, vacuola. La barra representa 0.5 μm .

3.1.2 Análisis de la Cinética de Crecimiento Celular

El crecimiento de las células en medio con metanol, generalmente comenzó después de una fase de adaptación de 4 a 6 hrs. El tiempo de generación fue de 4 hrs., aproximadamente.

Los procedimientos que se llevaron a cabo para la obtención de las condiciones óptimas de cultivo, en las que las células de *Hansenula polymorpha* presentaron por lo menos un peroxisoma, se describen a continuación: las células pre-cultivadas en YND líquido se incubaron en medio YNM líquido por 6 a 7 hrs. a 37°C bajo agitación constante. La figura 3 muestra la curva de crecimiento en metanol y se indica con una flecha la fase de crecimiento a la cual se obtuvieron las condiciones antes mencionadas.

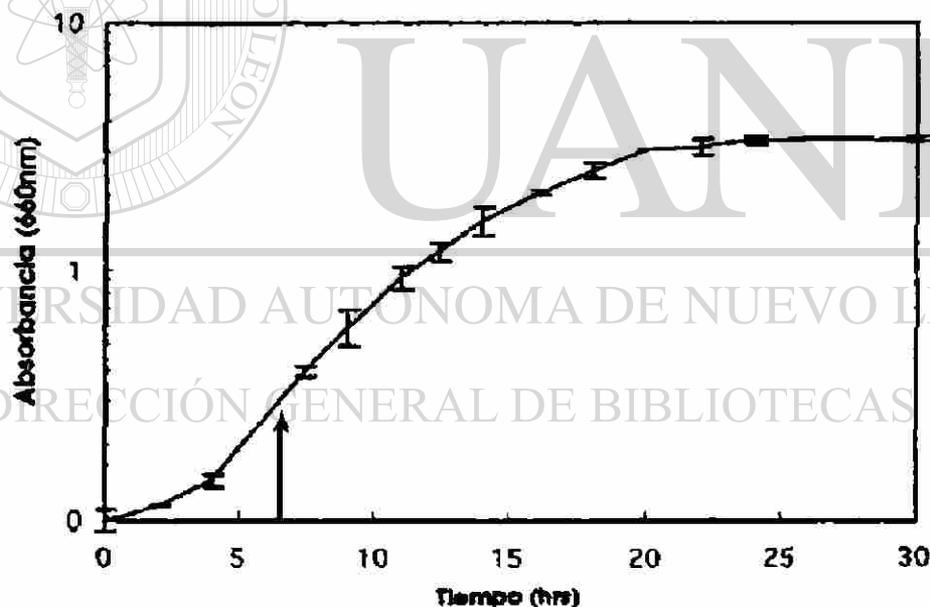


Figura 3. Cinética de Crecimiento Celular en Metanol de *Hansenula polymorpha*. Los valores representan el promedio de tres determinaciones \pm DS.

3.2 Evaluación del Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre los Peroxisomas de *Hansenula polymorpha*.

Las muestras de células obtenidas después de 60 y 120 min. en presencia de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de peroxisomicina A1, se evaluaron por microscopía electrónica de transmisión; se observó una interrupción en la continuidad de la membrana peroxisomal. No se observó daño en las membranas del resto de los organelos, bajo las mismas condiciones. En las muestras correspondientes a los 60 min., se observaron células que contenían un sólo peroxisoma, que generalmente presentaba fragmentación de la membrana (figura 4A); mientras que en las muestras de 120 min., ocasionalmente se observaron células con más de un peroxisoma, algunas de las cuales presentaban fragmentación de la membrana peroxisomal, y en otras no se observaron alteraciones morfológicas (figura 4B).

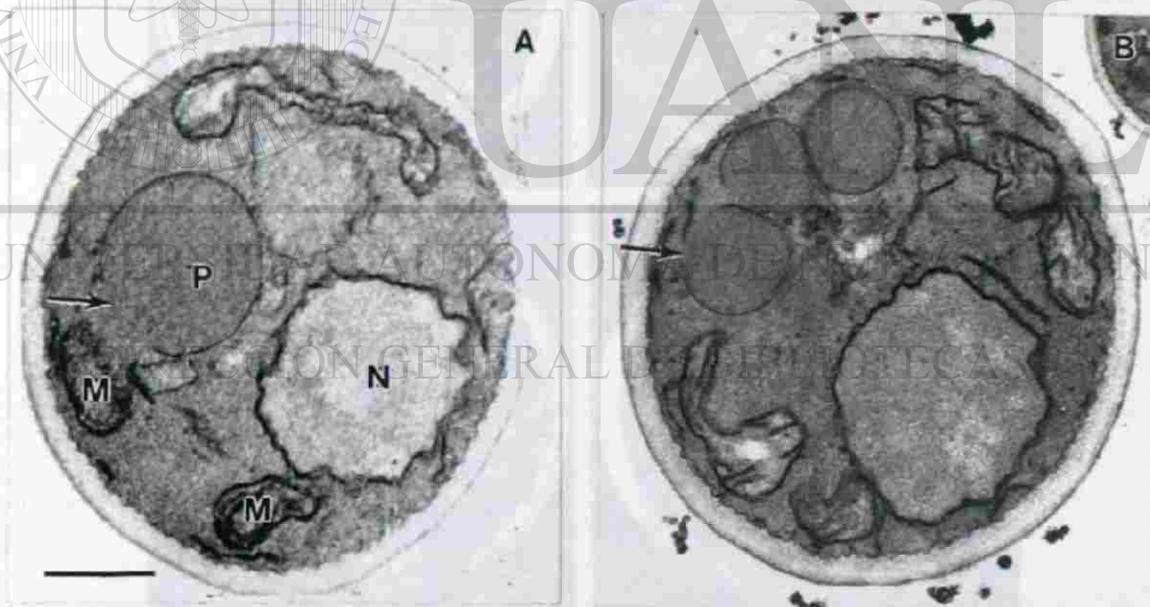


Figura 4. Micrografías Electrónicas de Transmisión de Células de *Hansenula polymorpha* Incubadas en Presencia de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Peroxisomicina A1, Obtenidas Después de 60 (A) y 120 Minutos (B): A) muestra el daño sobre un peroxisoma, caracterizado por interrupción en la continuidad de la membrana peroxisomal (flecha); B) muestra el daño sobre la membrana de dos de los peroxisomas presentes en la célula (flechas). N, núcleo; M, mitocondria; P, peroxisoma; V, vacuola. La barra representa 0.5 μm .

3.3 Aislamiento de Células con Disfunción Peroxisomal.

Por medio de la técnica de replicación en placa se detectó una colonia de células que no creció eficientemente en metanol, comparada con las células control sin toxina. Esta colonia se sembró por extensión sobre agar con glucosa. Después de que se formaron colonias se replicaron sobre agar con metanol y no se observó crecimiento en este sustrato (figura 5). Estas células que comenzaron a crecer lentamente hasta después de 8 a 10 días, representan la progenie de las células que estuvieron incubadas con la peroxisomicina A₁, y se denominaron células experimentales tipo I (células CEI).

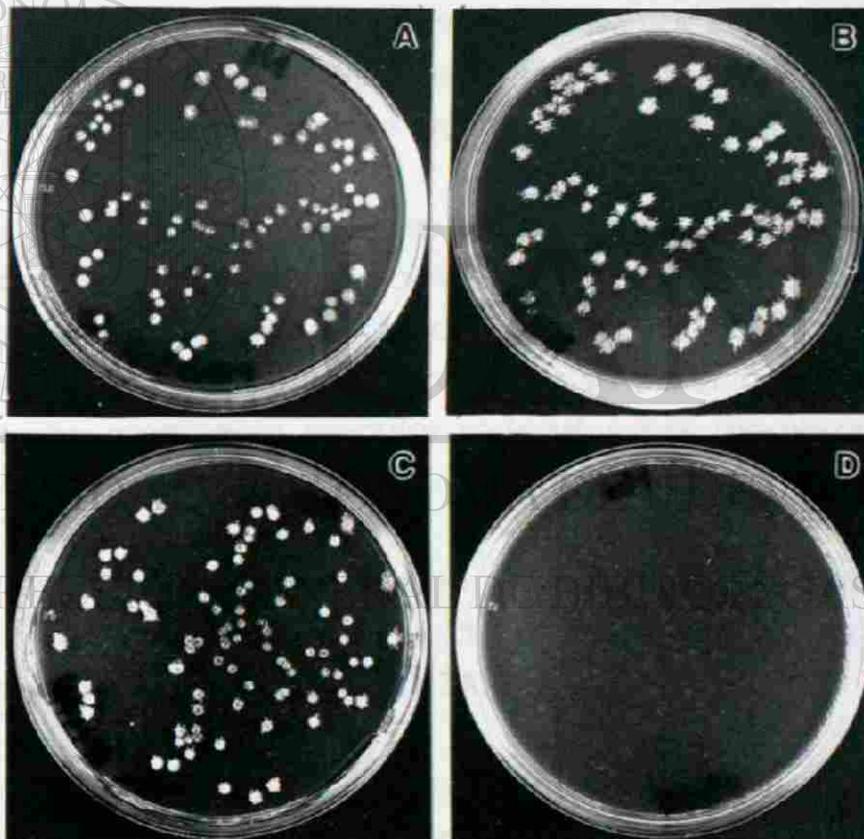


Figura 5. Técnica de Replicación en Placa. Las células control sin peroxisomicina A₁ y las células incubadas en presencia de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de peroxisomicina A₁ se diluyeron, se sembraron en placas de agar con glucosa al 0.5 % y posteriormente se replicaron sobre placas de agar con metanol al 0.5 %. Panel superior: Células control; A) glucosa, B) metanol. Panel inferior: C) muestra la progenie de la colonia de células deficientes en el crecimiento en metanol que se seleccionó (células CEI) y se sembró en glucosa; D) las colonias formadas en glucosa se replicaron en placas de agar con metanol; no se observa crecimiento en este sustrato.

3.4 Evaluación de la Función Peroxisomal en las Células Experimentales

3.4.1 Análisis Ultraestructural

La figura 6 muestra las diferencias ultraestructurales existentes entre las células control y las células CEI durante el cultivo en medio con metanol. A las 4 hrs. en las células control generalmente se observó un solo peroxisoma con morfología normal, así como el resto de los organelos celulares (figura 6A); mientras que en las células CEI se observó un solo peroxisoma pequeño de forma irregular, rodeado estrechamente por membranas pre-autofágicas (figura 6B). Estas membranas que rodean a la membrana peroxisomal, sólo se observaron en células que presentaron peroxisomas en proceso de autofagia que condujo a la degradación de estos organelos en la vacuola digestiva.

A las 8 y 12 hrs. se observó en las células control la presencia de dos o más peroxisomas con morfología normal (figuras 6C y 6E). Las figuras 6D y 6F presentan muestras correspondientes al cultivo de células CEI obtenidas a los mismos tiempos, en donde se observan peroxisomas pequeños, de morfología irregular rodeados por membranas pre-autofágicas (flechas).

Posteriormente, el complejo membrana pre-autofágica-peroxisoma se fusionó con la vacuola digestiva en donde se observó degradación del peroxisoma (figuras 7A, 7B y 7C).

Después de 24 hrs. de cultivo se observó en las células CEI, desorganización celular general y a las 48 hrs. imágenes típicas de muerte celular (figuras 8A y 8B).

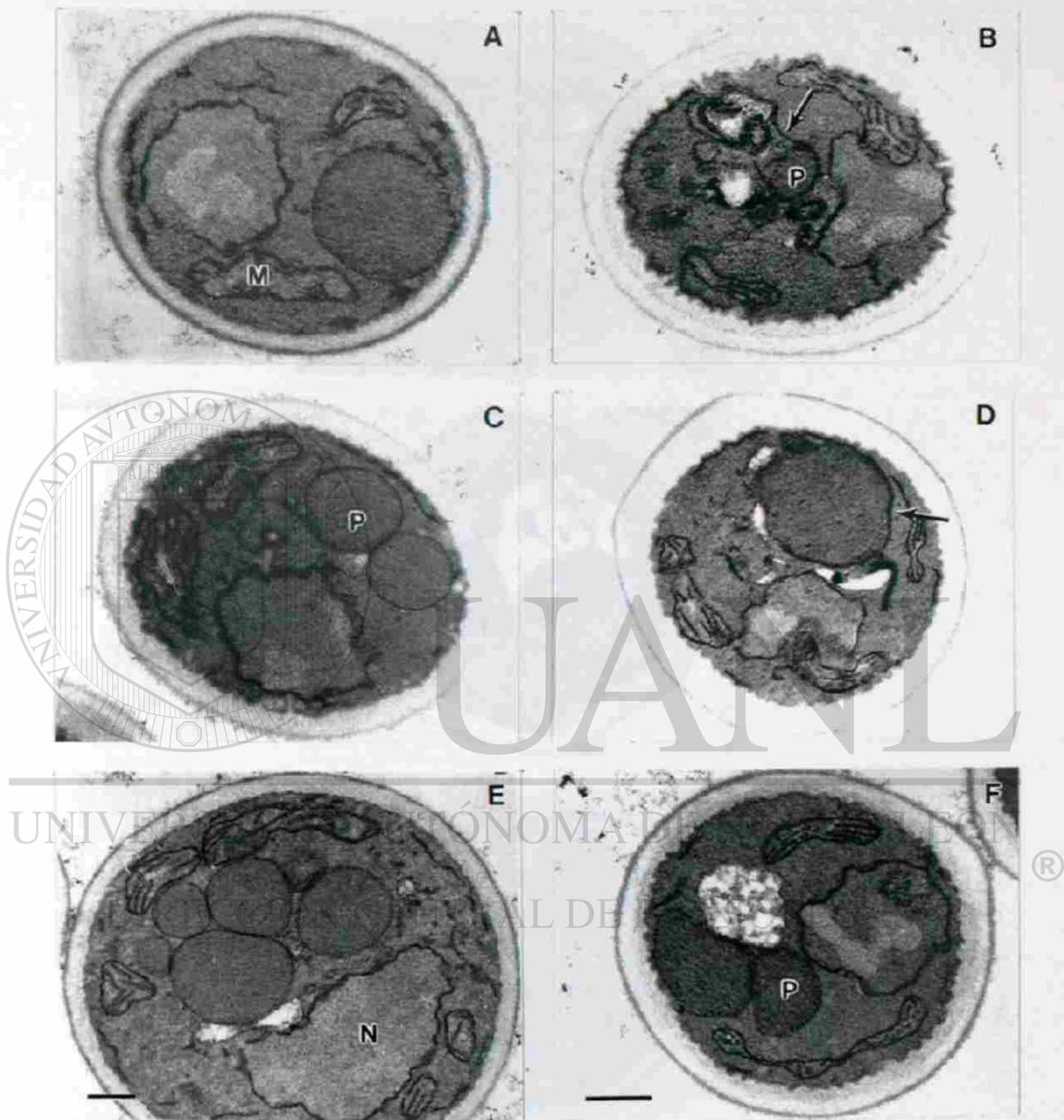


Figura 6. Micrografías Electrónicas de Transmisión de Células Control y Células CEI durante el Crecimiento en Metanol. El panel izquierdo muestra la ultraestructura de las células control a las 4, 8 y 12 hrs. (A, C y E, respectivamente). El panel derecho corresponde a las células CEI a los mismos tiempos de cultivo (B, D y F). Se observa la irregularidad en la morfología y número de los peroxisomas. Las flechas señalan la presencia de membranas pre-autofágicas. N, núcleo; P, peroxisoma; M, mitocondria; V, vacuola. La barra representa 0.5 μm .

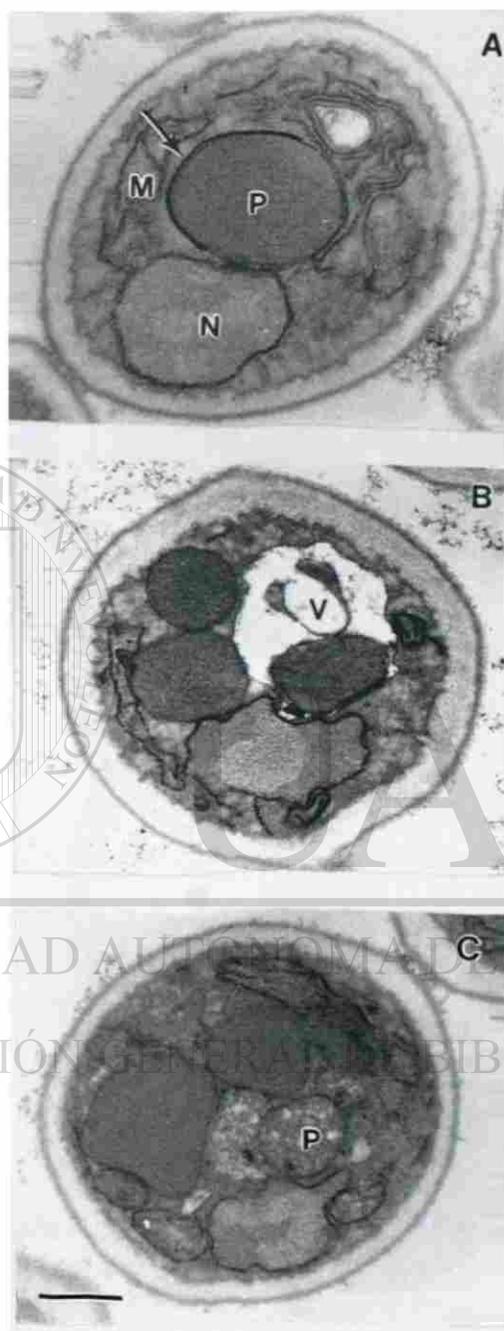
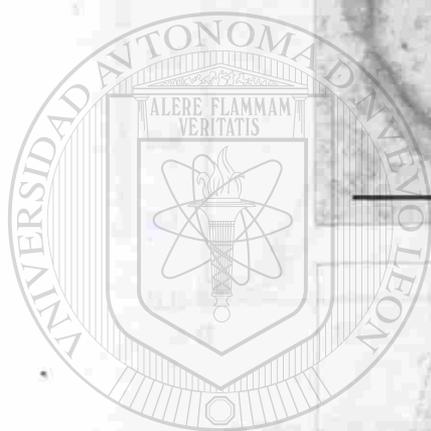


Figura 7. Micrografías Electrónicas de Transmisión de las Células CEI. A) muestra la asociación entre la membrana pre-autofágica y el peroxisoma (flecha). B) se observa un peroxisoma en el interior de la vacuola digestiva. C) muestra la degradación proteolítica del peroxisoma. N, núcleo; P, peroxisoma, M, mitocondria; V, vacuola. La barra representa 0.5 μm .



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Figura 8. Micrografías Electrónicas de Transmisión de las Células CEI. A) muestra la desorganización celular generalizada que presentan estas células después de 24 hrs. de cultivo en metanol. B) muestra células muertas después de 48 hrs. de cultivo. N, núcleo; P, peroxisoma; M, mitocondria, V, vacuola. La barra representa 0.5 μm .

3.4.2 Análisis de la Función Peroxisomal

En la figura 9 se muestra la gráfica de la cinética de crecimiento celular versus la capacidad de utilización del metanol, por las células control y las células CEI.

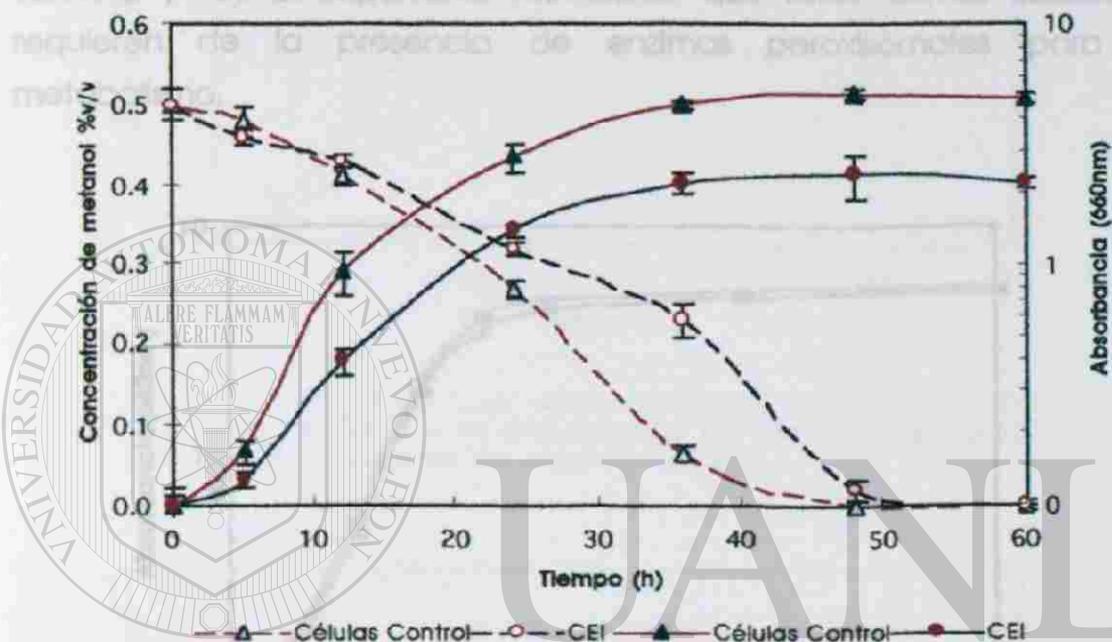


Figura 9. Cinética de Crecimiento Celular y Utilización de Metanol por las Células Control ($\blacktriangle, \triangle$) y Células CEI (\bullet, \circ). Cada valor representa la media de tres determinaciones \pm DS.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se observó que las células CEI son incapaces de crecer eficientemente en este sustrato ya que la densidad de estos cultivos siempre mostró valores por debajo de los obtenidos en los cultivos control. El tiempo de generación (t_d) calculado para las CEI fue de 6 hrs., mientras que el calculado para las células control fue de $t_d = 4$ hrs.. La tasa de utilización del metanol por las células CEI se encontró disminuída, ya que se detectó una concentración excedente de metanol del 18 % (13 mM) en la fase de crecimiento exponencial media (24 hrs.). A las 36 hrs. se detectó 3.6 veces más metanol (42 mM) que en los cultivos control

(16 mM), aunque las células CEI utilizaron todo el sustrato en un intervalo de tiempo similar al del control (60 hrs.).

Por otro lado, se observó que las células CEI crecieron en todas las fuentes de carbono y nitrógeno seleccionadas, sin embargo en etanol, metilamina y glicerol el crecimiento fue relativamente lento (figuras 10,11,12 y 13). Es importante mencionar que estos últimos sustratos requieren de la presencia de enzimas peroxisomales para su metabolismo.

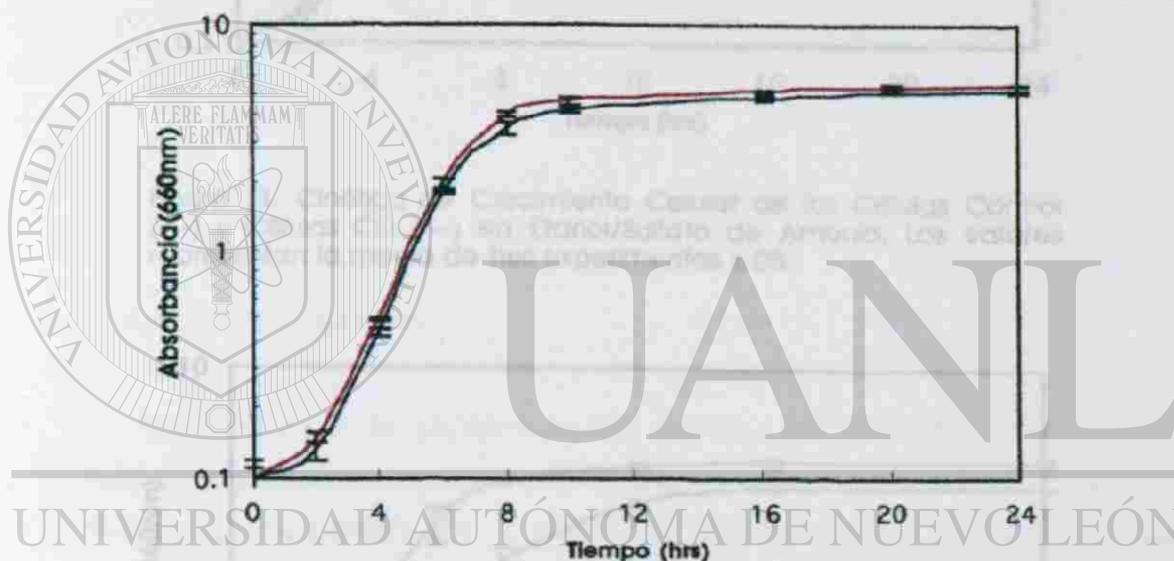


Figura 10. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEI (—) en Glucosa/Sulfato de Amonio. Los valores representan la media de tres experimentos \pm DS.

Figura 11. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEI (—) en Glucosa/Metilamina. Los valores representan la media de tres experimentos \pm DS.

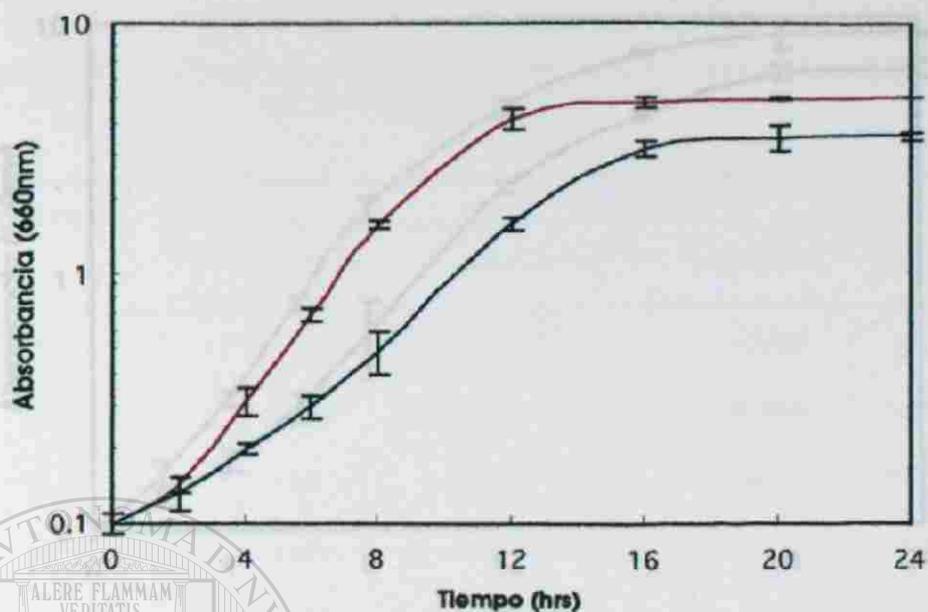


Figura 11. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEI (—) en Etanol/Sulfato de Amonio. Los valores representan la media de tres experimentos \pm DS.

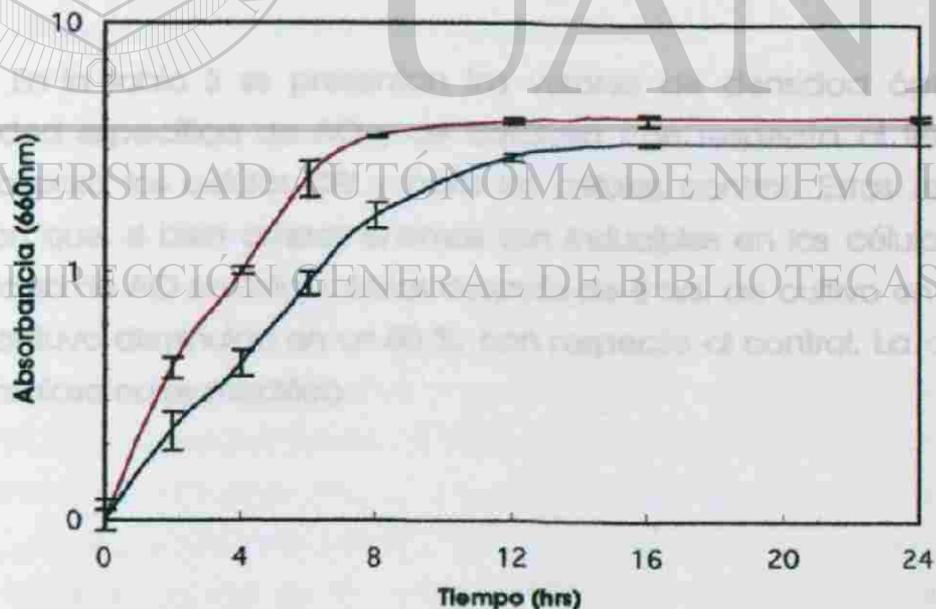


Figura 12. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEI (—) en Glucosa/Metilamina. Los valores representan la media de tres experimentos \pm DS.

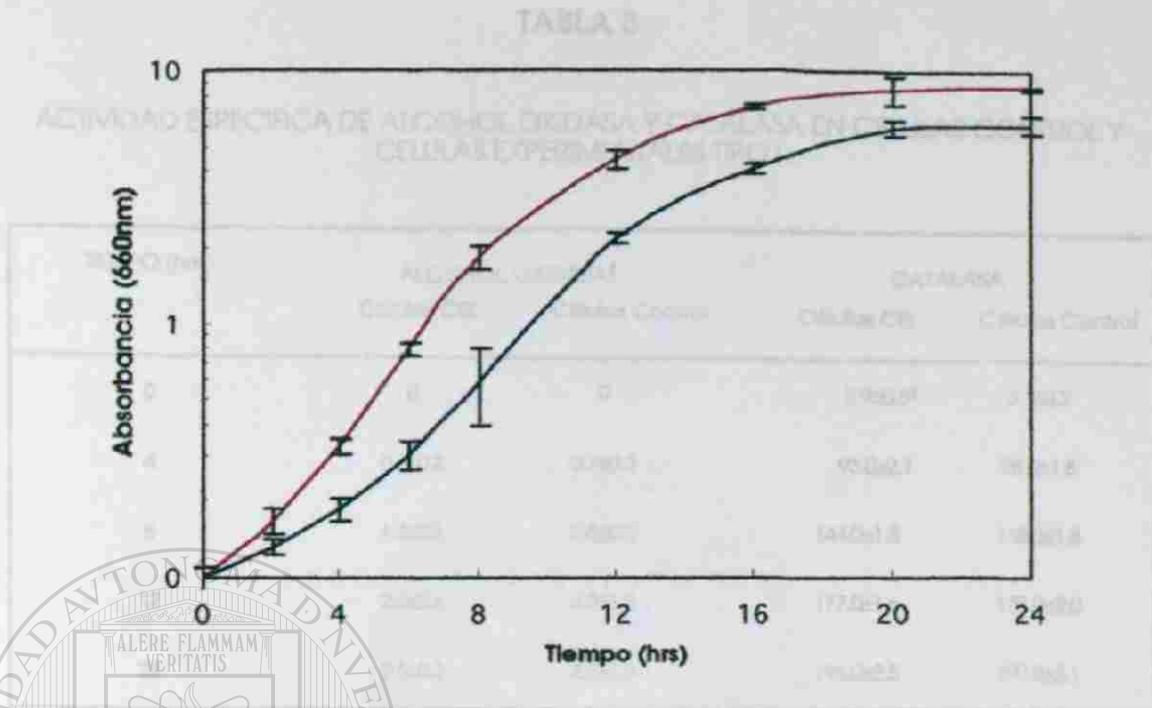


Figura 13. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (▲) y Células CEI (▼) en Glicerol/Sulfato de amonio. Los valores representan la media de tres experimentos \pm DS.

3.4.3 Análisis Bioquímico

En la tabla 3 se presentan los valores de densidad óptica y la actividad específica de AO y de catalasa con respecto al tiempo de cultivo para las células CEI y para las células control. Estos resultados indican que, si bien ambas enzimas son inducibles en las células CEI, la actividad de AO en estas células después de 8 hrs. de cultivo en metanol se mantuvo disminuida en un 50 %, con respecto al control. La actividad de catalasa no se modificó.

Los resultados que en las células CEI la actividad de AO estaba presente desde los primeros dos horas de cultivo en metanol. En la figura 14A se muestra la reacción positiva para AO dentro de los peroxisomas intactos, así como en algunas peroxisomas que se encuentran dentro de la vacuola. No se observa posibilidad de la reacción en ningún otro sitio de la célula.

TABLA 3

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE ALCOHOL OXIDASA Y CATALASA EN CELULAS CONTROL Y CELULAS EXPERIMENTALES TIPO I

TIEMPO (hrs.)	ALCOHOL OXIDASA [§]		CATALASA	
	Células CEI	Células Control	Células CEI	Células Control
0	0	0	2.9±0.8 [¶]	3.1±0.2
4	0.7±0.2	0.7±0.3	93.0±2.1	98.0±1.8
8	1.2±0.1	2.5±0.3	144.0±1.5	148.0±1.8
12	2.3±0.5	4.2±1.2	177.0±1.6	173.0±2.0
24	2.5±0.2	4.7±1.5	196.0±2.5	190.0±3.1

[§]La actividad de alcohol oxidasa se expresa como Unidades•mg proteína⁻¹ y la de catalasa como $\Delta A_{240} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

[¶]Cada valor representa la media de tres determinaciones ± DS.

3.4.4 Análisis Citoquímico e Inmunocitoquímico

Se realizaron estudios de citoquímica e Inmunocitoquímica para identificar una probable relación existente entre los valores disminuidos de la actividad específica de AO obtenidos en las células CEI, con el posible importe deficiente de la AO hacia los peroxisomas.

Los estudios citoquímicos mostraron que en las células CEI la actividad de AO estaba presente desde las primeras dos horas de cultivo en metanol. En la figura 14A, se muestra la reacción positiva para AO dentro de los peroxisomas intactos, así como en algunos peroxisomas que se encuentran dentro de la vacuola. No se observa positividad de la reacción en ningún otro sitio de la célula.

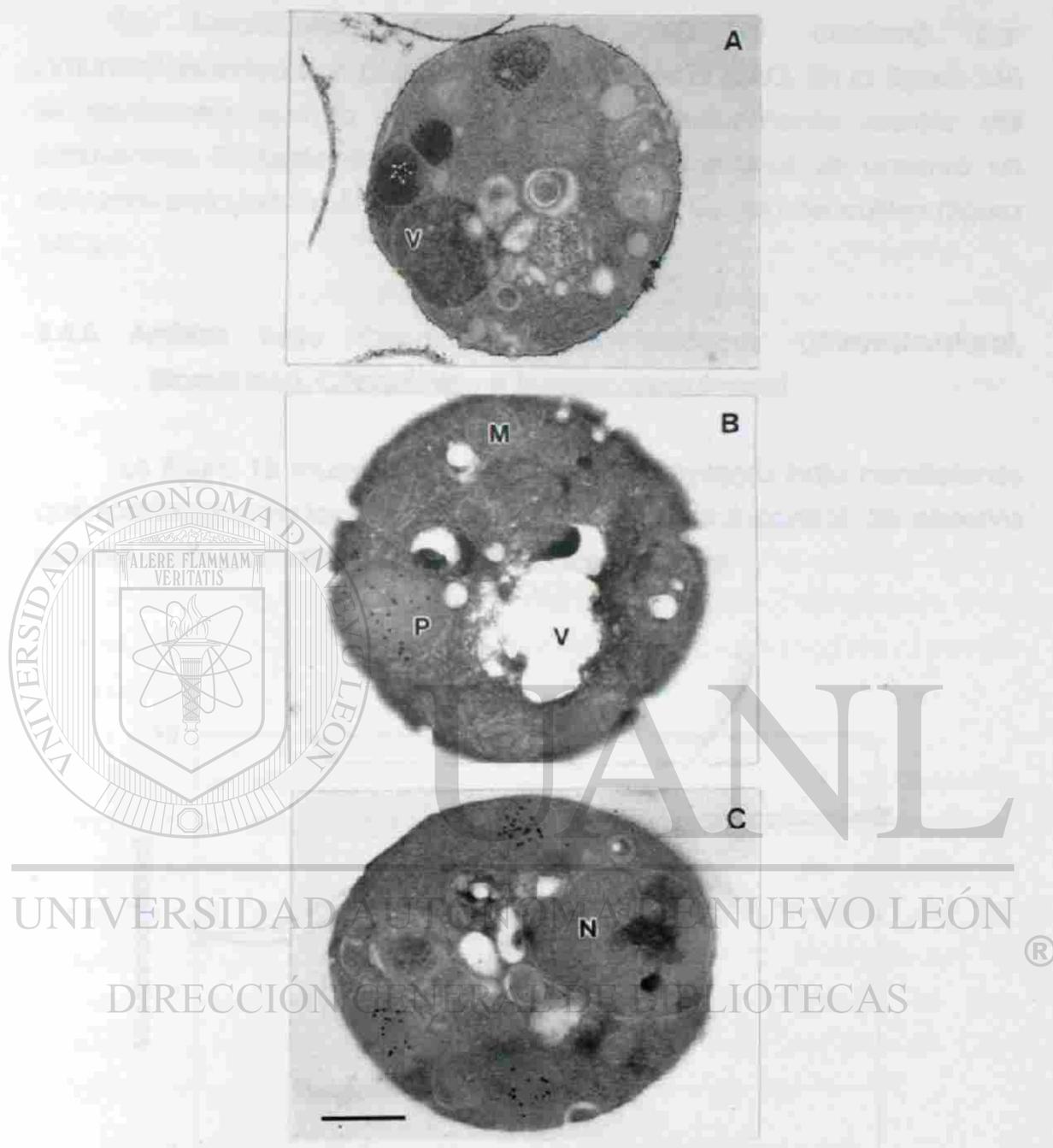


Figura 14. Micrografías Electrónicas de Transmisión del Análisis Citoquímico e Inmunocitoquímico para la Localización Subcelular de AO en las Células CEI. Las células se pre-cultivaron en glucosa al 0.5 % y posteriormente se transfirieron a medio con metanol al 0.5 %. A) muestra obtenida a las 2 hrs. de cultivo; se observa que la actividad de AO (*) se localiza dentro de los peroxisomas intactos así como en un peroxisoma que se encuentra dentro la vacuola digestiva. B) se observan las partículas de oro coloidal dentro de los peroxisomas, lo que indica la localización de la AO dentro de estos organelos. C) muestra obtenida después de 4 hrs. de cultivo, que muestra la inducción de la AO con respecto al tiempo. N, núcleo; P, peroxisoma; M, mitocondria, V, vacuola. La barra representa 0.5 μ m.

La localización subcelular de AO se confirmó por inmunocitoquímica con anticuerpos específicos anti-AO. En la figura 14B se demuestra que la AO se localiza exclusivamente dentro del peroxisoma. Después de 4 hrs. de cultivo en metanol, se observó un aumento en la inducción de AO con respecto al tiempo de cultivo (figura 14C).

3.4.5 Análisis bajo Condiciones Quimiostáticas (Ultraestructural, Bioquímico, Citoquímico e Inmunocitoquímico)

La figura 15 muestra la cinética de crecimiento bajo condiciones quimiostáticas para las células CEI y para las células control. Se observa que no existe gran diferencia entre las dos cinéticas.

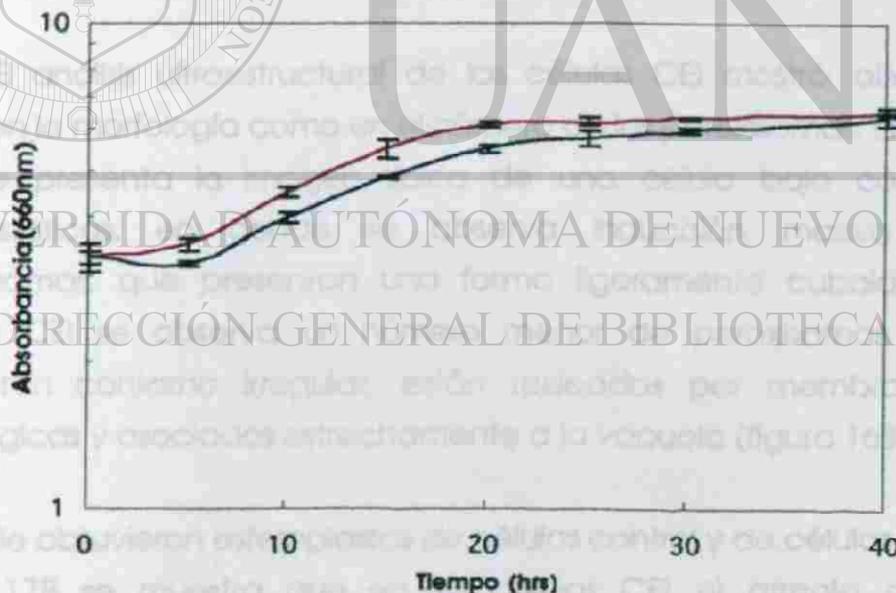


Figura 15. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEI (—) bajo Condiciones Quimiostáticas (glucosa 0.25 %/Metanol 0.30 %). Los valores representan la media de tres experimentos \pm DS.

En ambos casos, durante el cultivo en glucosa se obtuvo una DO_{660} de 3.3 unidades. En el cultivo de células CEI la DO_{660} aumentó paulatinamente hasta 6.6 unidades después de la adición de la mezcla glucosa/metanol, ésta DO_{660} permaneció constante durante todo el cultivo; mientras que en el cultivo de células control se obtuvo una DO_{660} ligeramente mayor (7.0 unidades de DO_{660}/mL). Se determinó la concentración de glucosa y de metanol en el medio de cultivo para ambos cultivos en la fase de crecimiento en equilibrio, y no se detectó la presencia de estos sustratos, lo que indicó que las células los utilizaron por completo.

Se determinó la actividad específica de AO y la de catalasa en extracto libre de células. En las células CEI se obtuvo una actividad específica de AO de $2.2 U(mg.proteína)^{-1}$, valor significativamente más bajo que el obtenido en los cultivos control (8.0). La actividad de catalasa no se modificó.

El análisis ultraestructural de las células CEI mostró alteraciones tanto en la morfología como en el número de los peroxisomas. En la figura 16A se presenta la imagen típica de una célula bajo condiciones quimiostáticas, en donde se observa inducción masiva de los peroxisomas, que presentan una forma ligeramente cuboide. En las células CEI se observa un número menor de peroxisomas, los que presentan contorno Irregular, están rodeados por membranas pre-autofágicas y asociados estrechamente a la vacuola (figura 16B).

Se obtuvieron esferoplastos de células control y de células CEI. En la figura 17B se muestra que en las células CEI el arreglo cristalal de característico de la AO se encuentra dentro de los peroxisomas y en el interior de la vacuola digestiva, lo que indica degradación peroxisomal. En la figura 17A se muestra que en las células control, el arreglo cristalal de la AO se encuentra únicamente en los peroxisomas.

La degradación de peroxisomas en las células CEI se confirmó por inmunocitoquímica con anticuerpos específicos anti-AO y marcaje con oro coloidal-proteína A. En la figura 17C se observa que la marca se encuentra localizada en un peroxisoma en proceso de degradación en el interior de la vacuola autofágica.

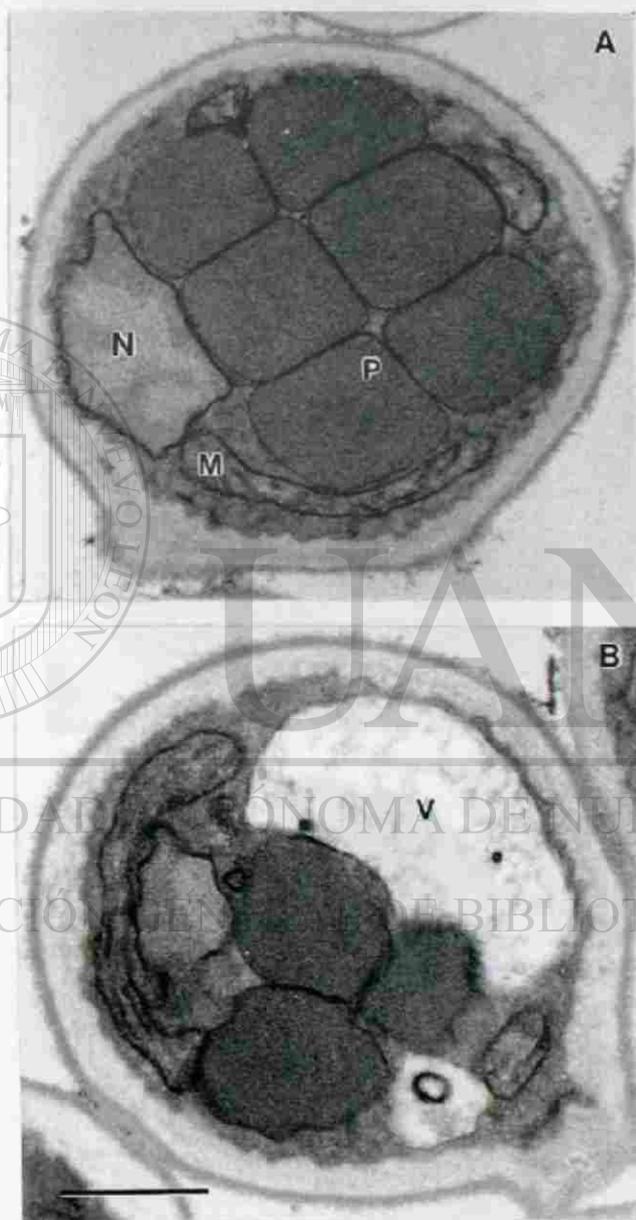


Figura 16. Micrografías Electrónicas de Transmisión de las Células Control y de las Células CEI bajo Condiciones Quimiostáticas. A) muestra la inducción peroxisomal característica de células control bajo estas condiciones. B) se observa en las células CEI un menor número de peroxisomas con morfología anormal y rodeados por la vacuola autofágica. N, núcleo; P, peroxisoma; M, mitocondria, V, vacuola. La barra representa 0.5 μm .

B.S. Abdolmohammadi y Caracterización Ultraestructural de *Al. polytrapezoides* (Lam.)
 con Distribución Pericardial.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir que la presencia de los esferoplastos en las células control y en las células CEI bajo condiciones quimiostáticas, sugiere que la presencia de estos orgánulos es una característica de las células de *Al. polytrapezoides*.

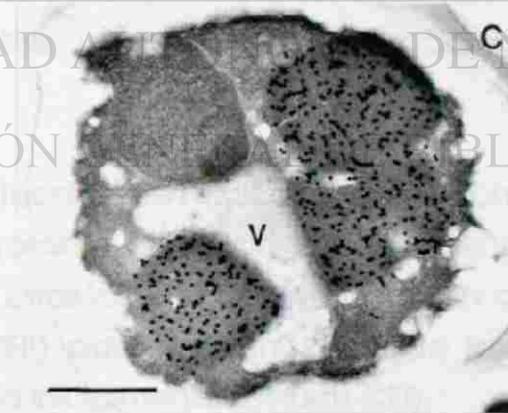
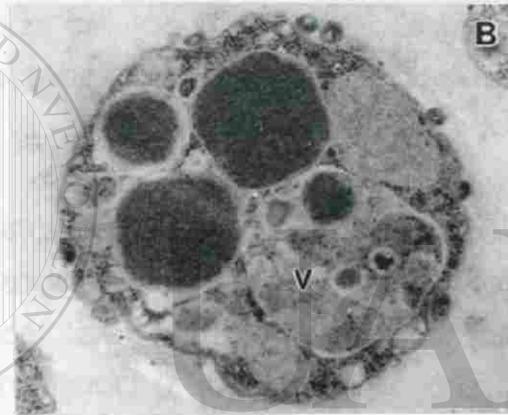
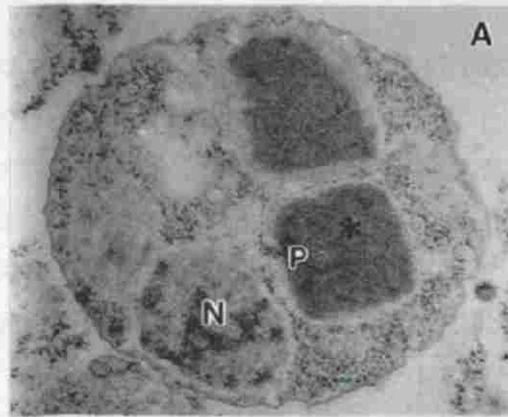


Figura 17. Micrográficas Electrónicas de Transmisión de esferoplastos de las Células Control y de las Células CEI bajo Condiciones Quimiostáticas. A) Células control: muestra el arreglo cristalino de la AO (*) dentro del peroxisoma. Células CEI: B) muestra la estructura cristalino dentro de la vacuola; C) muestra la localización de la AO dentro de un peroxisoma en proceso de degradación. N, núcleo; P, peroxisoma; M, mitocondria, V, vacuola. La barra representa 0.5 μm .

3.5 Aislamiento y Caracterización de Células de *H. polymorpha leu1-1* con Disfunción Peroxisomal.

De acuerdo con los datos ultraestructurales, bioquímicos fisiológicos, citoquímicos e inmunocitoquímicos obtenidos, las células CEI presentaron disfunción peroxisomal, sin embargo esta disfunción no se caracterizaba por la ausencia total de peroxisomas, sino por la presencia de peroxisomas con características morfológicas y funcionales deficientes. Debido a esto se procedió a realizar experimentos para aislar células de una cepa de *H. polymorpha* con un marcador auxotrófico, que presentara las mismas características de disfunción peroxisomal que las células CEI. Estas células serían utilizadas para caracterizar a nivel molecular el daño producido por la peroxisomicina A₁.

Después de incubar células de *H. polymorpha leu1-1* en presencia de 5 µg/mL de peroxisomicina A₁ y de analizar las muestras por MET, se observó que las células contenían peroxisomas cuya membrana se encontraba fragmentada (figura 18). De esta forma se reprodujo el mismo efecto de la peroxisomicina A₁ obtenido en la sección 3.2, en esta ocasión sobre una cepa de levaduras con un marcador auxotrófico.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se utilizó la técnica de replicación en placa y se aisló una colonia de células que presentó dificultad para crecer en metanol en medio sólido (figura 19). Estas células se denominaron células experimentales tipo II (células CEII) para diferenciarlas de las células de la cepa prototrófica aislada inicialmente (células CEI).



Figura 18. Micrografía Electrónica de Transmisión de Células de *Hansenula polymorpha leu1-1* Incubadas en Presencia de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Peroxisomicina A₁, Obtenidas Después de 60 Minutos. Se muestra el daño sobre un peroxisoma observándose una interrupción de la continuidad de la membrana peroxisomal (flecha), mientras que el otro peroxisoma se encuentra rodeado por una membrana pre-autofágica (punta de flecha). N, núcleo; M, mitocondria; P, peroxisoma; V, vacuola. La barra representa 0.5 μm .

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los peroxisomas (PE) se encuentran en animales y en plantas eucariotas. Su estructura se observó por las células PE presentando un núcleo de muy sencilla estructura. En la figura 18A se muestra a las células PE presentando peroxisomas en forma de gránulos rodeados por membranas pre-autofágicas. A través de estas estructuras (PE) se observa que las células contienen un gran número de gránulos y que estos son de tamaño pequeño (figura 20). Los orgánulos citados se encuentran en diferentes estados de degradación (figura 20C).

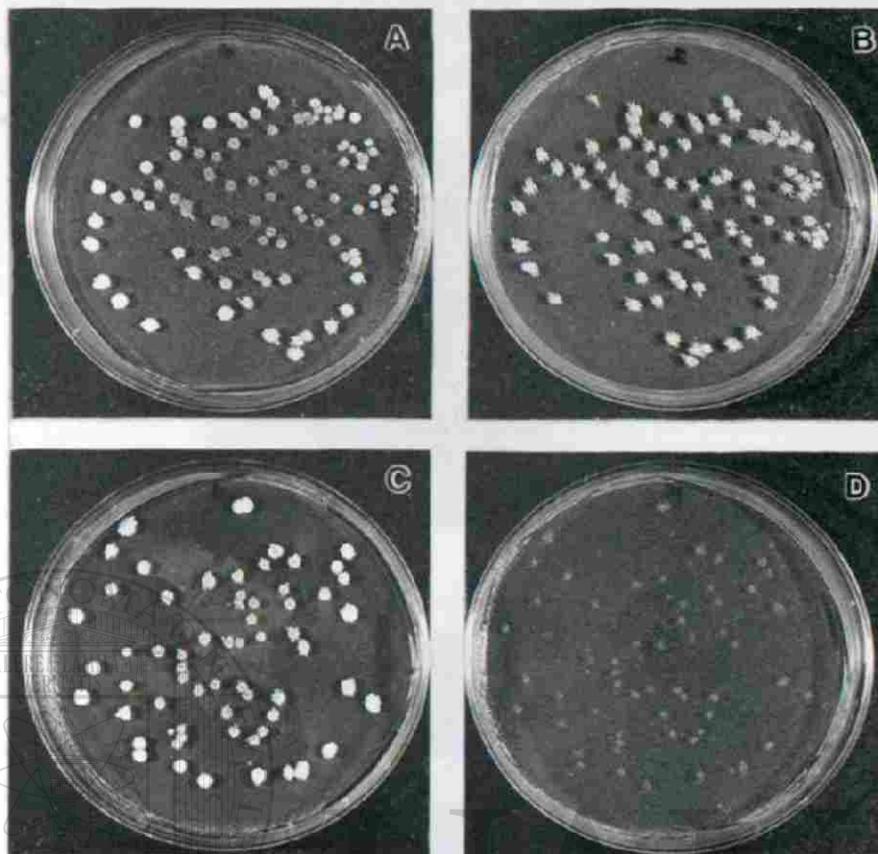
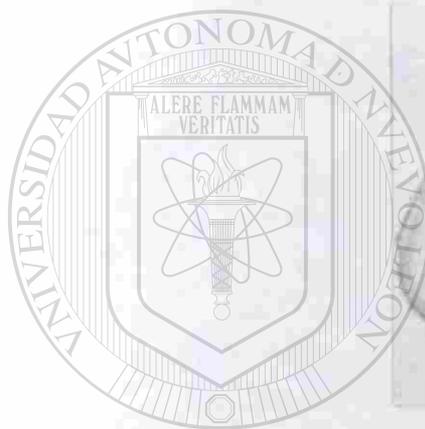


Figura 19. Técnica de Replicación en Placa. Las células control sin peroxisomicina A₁ y las células incubadas en presencia de 5 µg/mL de peroxisomicina A₁ se diluyeron, se sembraron en placas de agar con glucosa al 0.5 % y posteriormente se replicaron sobre placas de agar con metanol al 0.5 %. Panel superior: Células control; A) glucosa, B) metanol. Panel inferior: C) muestra la progenie de la colonia deficiente en el crecimiento en metanol (células CEII) que se seleccionó y se sembró en glucosa; D) las colonias formadas en glucosa se replicaron en placas de agar con metanol; no se observa crecimiento en este sustrato.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Las células CEII se cultivaron en metanol y se analizaron ultraestructuralmente. Se observó que las células CEII presentaron características muy similares a las células CEI. En la figura 20A se muestra que las células CEII presentan peroxisomas de forma irregular, rodeados por membranas pre-autofágicas. A tiempos de cultivo prolongados (12 hrs.) se observó que las células contenían un menor número de peroxisomas, y que estos eran de tamaño pequeño (figura 20B); algunos peroxisomas se encontraban en diferentes estadios de degradación (figura 20C).

En la base experimental de autólisis se observó que las células CEII degeneradas con mayor intensidad que las células CEI bajo las mismas condiciones de cultivo. En el cultivo de células CEII se observó (Figura 20) el crecimiento de la membrana pre-autofágica y su asociación con el núcleo de células CEII en el cultivo de células CEII (Figura 21A y 21B).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

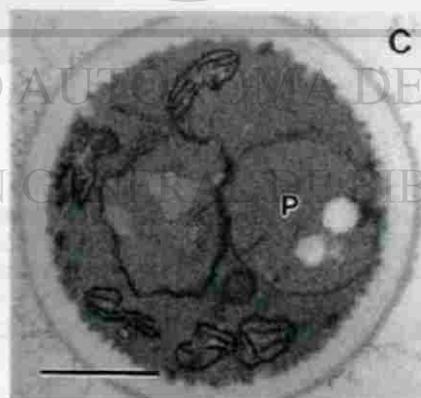
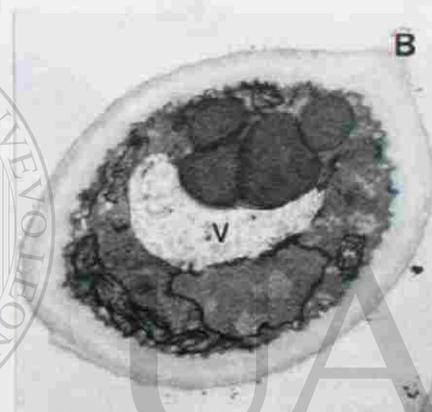
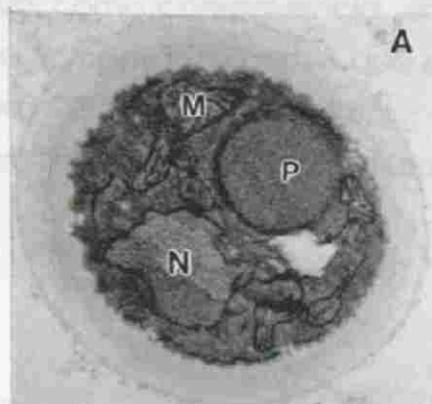
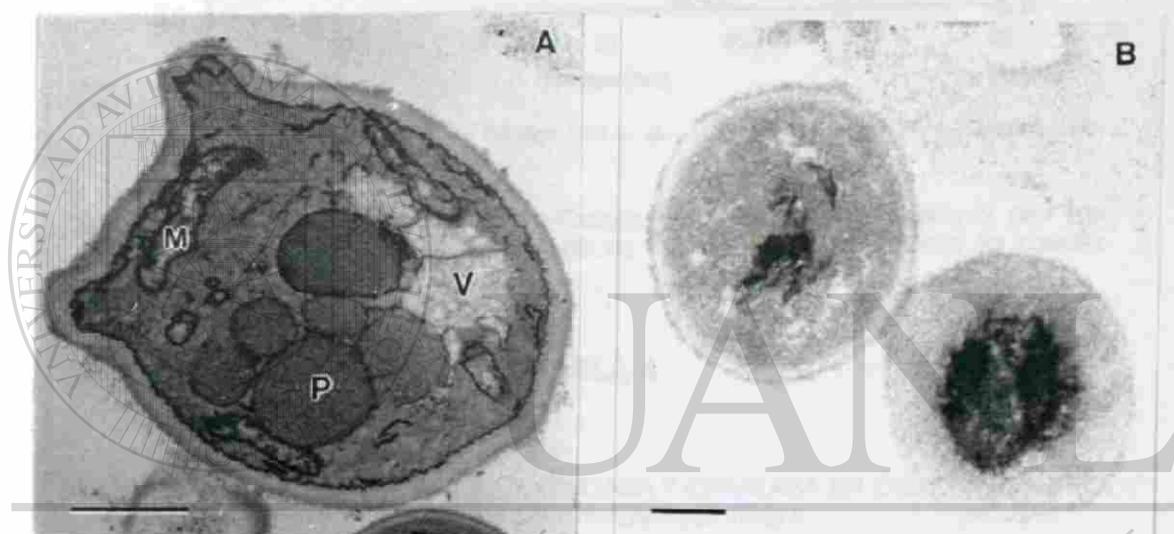


Figura 20. Micrografías Electrónicas de Transmisión de las Células CEII. Las células se precultivaron en glucosa al 0.5 % y posteriormente se transfirieron a medio con metanol al 0.5 %. A) muestra obtenida después de 4 hrs. de cultivo en donde se observa la asociación entre la membrana pre-autofágica y el peroxisoma de las células CEII. B) muestra obtenida a las 12 hrs. de cultivo en donde se observa anomalía en el número y tamaño de los peroxisomas presentes en las células CEII C) muestra un peroxisoma en proceso de degradación. N, núcleo; P, peroxisoma; M, mitocondria; V, vacuola. La barra representa 0.5 μ m.

En la fase estacionaria de crecimiento se observó que las células CEII degeneraron con mayor rapidez que las células CEI bajo las mismas condiciones de cultivo; como consecuencia, en el cultivo de células CEII cesó el crecimiento a tiempos más cortos que en el cultivo control y que en el cultivo de células CEI. Bajo estas condiciones, en el cultivo de células CEII se observó desorganización y muerte celular (figura 21A y 21B).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 21. Micrografías Electrónicas de Transmisión de las Células CEII Obtenidas en la Fase Estacionaria de Crecimiento. A) muestra obtenida después de 24 hrs. de cultivo en donde se observa desorganización celular generalizada. B) muestra obtenida a las 48 hrs. de cultivo en donde se observan varias células muertas. N, núcleo; P, peroxisoma; M, mitocondria; V, vacuola. La barra representa 0.5 μm .

Se analizó la cinética de crecimiento celular en metanol, la capacidad de utilización del metanol y se determinó la actividad específica de AO y la de catalasa. Se obtuvieron resultados muy similares a los obtenidos para las células CEI (figura 22 y tabla 4).

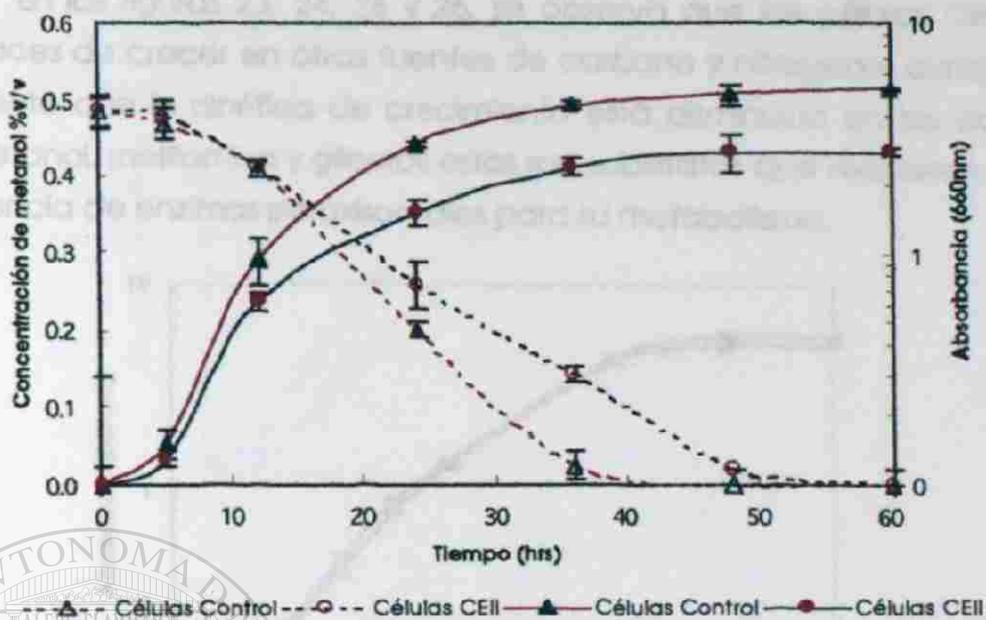


TABLA 4

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE ALCOHOL OXIDASA Y CATALASA EN CELULAS CONTROL Y CELULAS EXPERIMENTALES TIPO II

TIEMPO (hrs.)	ALCOHOL OXIDASA [§]		CATALASA	
	Células CEII	Células Control	Células CEII	Células Control
0	0	0	2.60±0.20 [¶]	3.00±0.10
4	0.65±0.10	0.72±0.20	98.00±2.20	102.00±1.50
8	1.60±0.20	2.80±0.10	156.00±1.20	158.00±1.40
12	2.70±0.30	4.60±0.80	182.00±1.40	178.00±2.10
24	2.80±0.20	5.00±1.20	193.00±2.20	186.00±3.50

[§]La actividad de alcohol oxidasa se expresa como Unidades·mg proteína⁻¹ y la de catalasa como $\Delta A_{240} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

[¶]Cada valor representa la media de tres determinaciones ± DS.

En las figuras 23, 24, 25 y 26, se observa que las células CEII son capaces de crecer en otras fuentes de carbono y nitrógeno, aunque es evidente que la cinética de crecimiento está disminuída en los cultivos con etanol, metilamina y glicerol; estos son sustratos que requieren de la presencia de enzimas peroxisomales para su metabolismo.

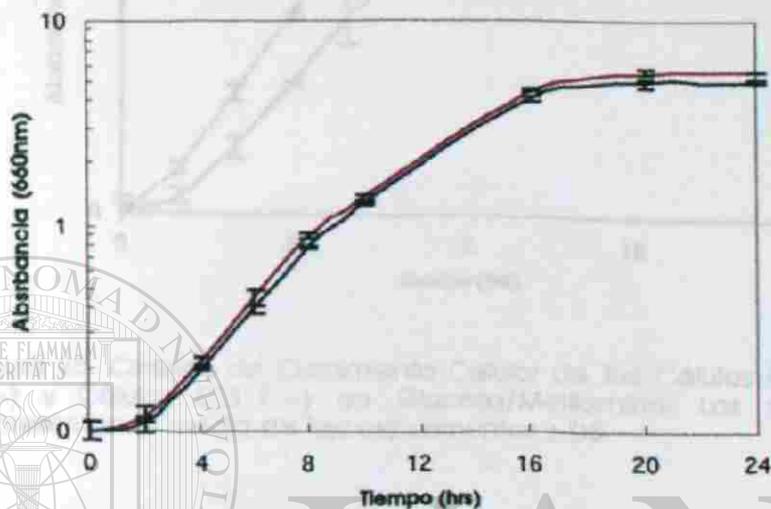


Figura 23. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEII (—) en Glucosa/Sulfato de Amonio. Los valores representan la media de tres experimentos \pm DS.

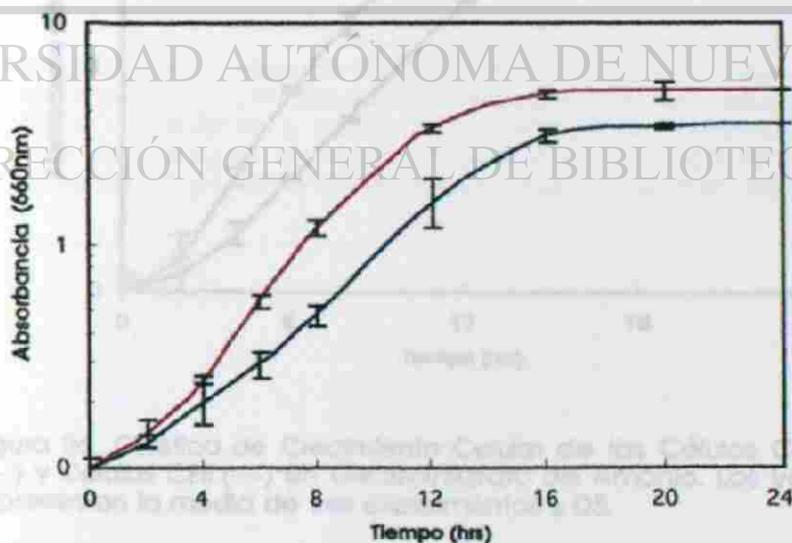


Figura 24. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEII (—) en Etanol/Sulfato de Amonio. Los valores representan la media de tres experimentos \pm DS.

La figura 27 muestra el crecimiento de las células control y células CEII en presencia de la penicilina G, en donde se observa que las células control crecen más rápidamente que las células CEII, lo que indica que éstas son más sensibles a la penicilina G. Con estos resultados se puede concluir que la presentación de las células CEII en presencia de la penicilina G es más lenta que la de las células control.

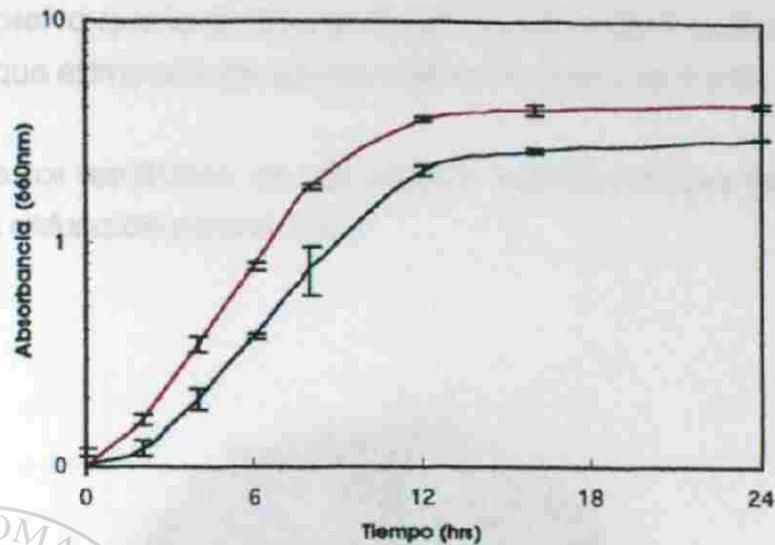


Figura 25. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEII (—) en Glucosa/Metilamina. Los valores representan la media de tres experimentos \pm DS.

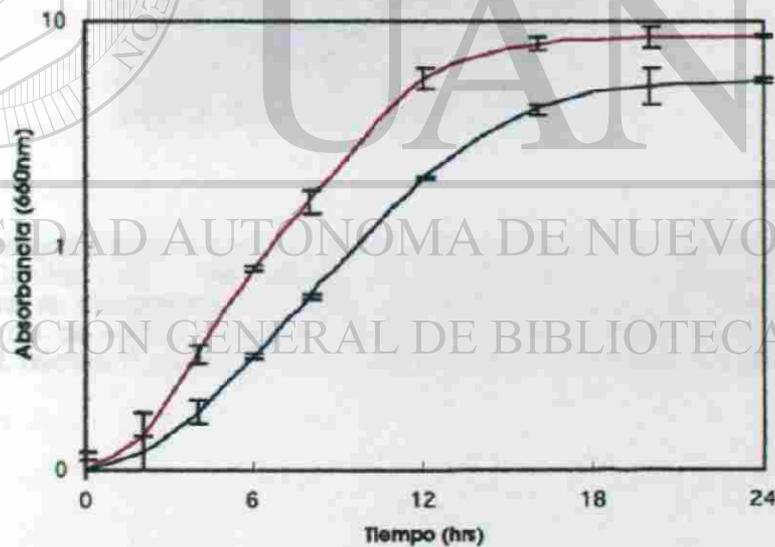


Figura 26. Cinética de Crecimiento Celular de las Células Control (—) y Células CEII (—) en Glicerol/Sulfato de Amonio. Los valores representan la media de tres experimentos \pm DS.

La figura 27 muestra el análisis inmunocitoquímico para la AO, en donde se observa que la enzima se localiza dentro de los peroxisomas, lo que indica que el importe de esta proteína no está afectado.

Con estos resultados, se estableció que las células CEII también presentaron disfunción peroxisomal.

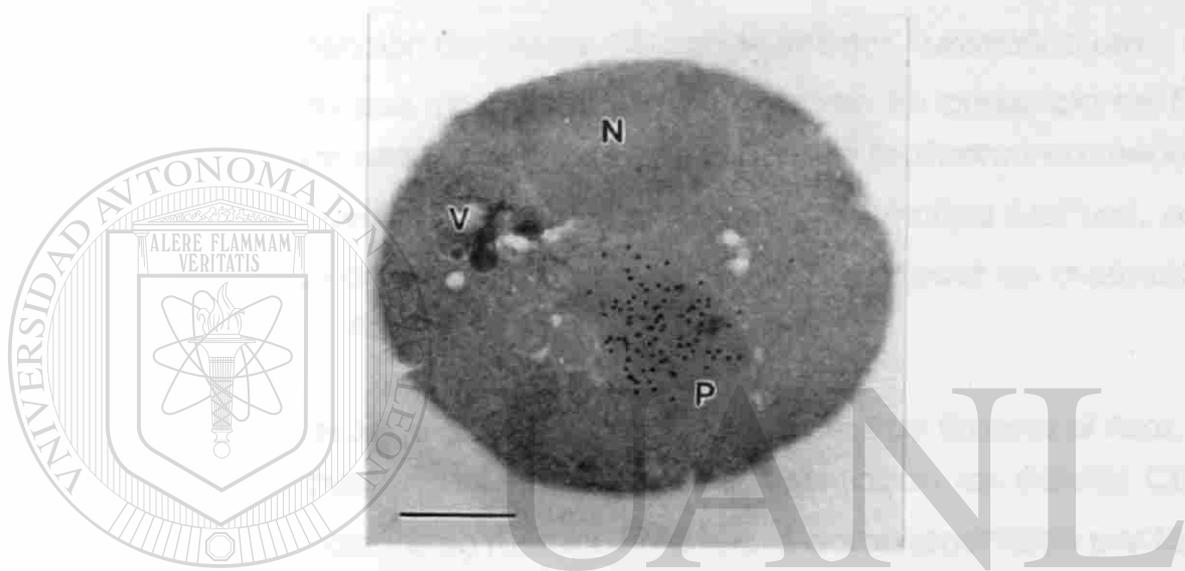


Figura 27. Micrografía Electrónica de Transmisión del Análisis Inmunocitoquímico para AO en las Células CEII. Las células se pre-cultivaron en glucosa al 0.5 % y posteriormente se transfirieron a medio con metanol al 0.5 %. Muestra obtenida después de 4 hrs. de cultivo en donde se observa la localización de la AO dentro del peroxisoma. N, núcleo; P, peroxisoma; M, mitocondria; V, vacuola. La barra representa 0.5 μm .

3.5.1 Análisis Genético

Para establecer si la disfunción peroxisomal que presentaban las células CEI y las células CEII se debía a un defecto genético, se realizaron experimentos de apareamiento, complementación y análisis de esporas al azar. Para tal efecto, se obtuvo una cepa de células CEI con marcador auxotrófico.

3.5.1.1 Obtención de Células CEI con Marcador Auxotrófico *ura⁻*.

Después de que las células CEI se incubaron en presencia de 5-FOA y las colonias resistentes a este compuesto se replicaron en medio selectivo, se obtuvo una colonia que mostró un fenotipo *Mut⁻ura⁻*, es decir incapaz de crecer en metanol e incapaz de crecer en ausencia de uracilo (auxotrófica para uracilo).

3.5.1.2 Ensayos de Complementación y Análisis de Esporas al Azar.

Para establecer si el defecto que presentaban las células CEI (crecimiento deficiente en metanol; *Mut⁻*) era complementado por las células CEII, se realizaron experimentos de complementación genética. Las células diploides que se obtuvieron de la cruce entre las cepas CEI *Mut⁻ura⁻* y CEII *Mut⁻leu1-1* crecieron normalmente en metanol a la misma velocidad que las células control; así mismo, las células diploides obtenidas de la cruce entre las cepas CEI *Mut⁻ura⁻* y CEII *Mut⁻leu1-1* con sus respectivas cepas isogénicas que contenían marcadores complementarios, crecieron normalmente en metanol (sin marcadores; uracilo o leucina). Estos resultados indicaron que no hubo complementación entre ambas cepas CEI y CEII.

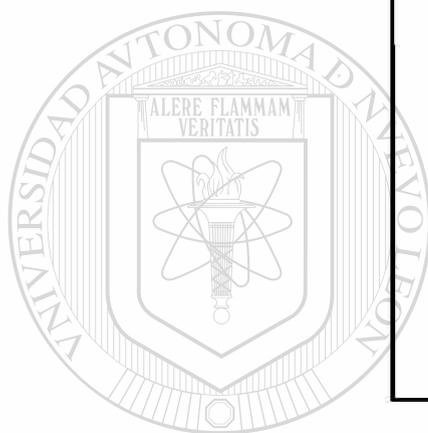
Por otro lado el análisis de esporas al azar, mostró que el 74 % de la progenie creció normalmente en metanol, lo que indicó que el defecto en ambas cepas es de carácter recesivo y además confirmó que no se

complementan entre ellas. La tabla 5 muestra el número de casos con respecto al fenotipo observado.

TABLA 5

ANALISIS DE ESPORAS AL AZAR

FENOTIPO	CASOS
<i>leu Mut⁻</i>	6
<i>leu Mut⁺</i>	35
<i>ura Mut⁻</i>	8
<i>ura Mut⁺</i>	7
<i>uraleu Mut⁻</i>	10
<i>uraleu Mut⁺</i>	34
TOTAL	100



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



CAPITULO 4

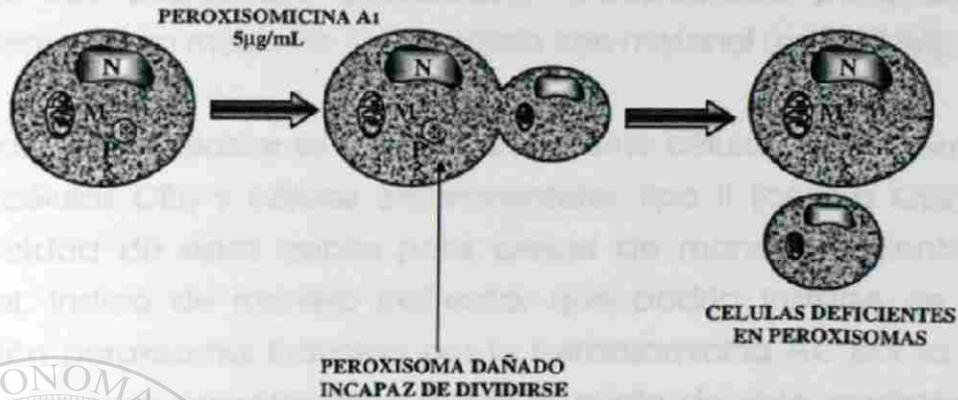
DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten aceptar la hipótesis de trabajo propuesta, ya que se aislaron dos cepas de la levadura *H. polymorpha* con disfunción peroxisomal, después de realizar cultivos en presencia de una dosis no letal (5 µg/mL) de peroxisomicina A1.

En la presente investigación no se consideró el establecer la capacidad mutagénica de la peroxisomicina A1. Sin embargo, es una duda que hasta el momento permanece y obliga a cuestionar: ¿es la peroxisomicina A1 un agente mutágeno?. Por lo anterior, es importante señalar los posibles mecanismos por los cuales la peroxisomicina A1 podría causar disfunción peroxisomal en células de *Hansenula polymorpha* (figura 28).

1. La peroxisomicina A1 podría dañar directamente a la membrana del peroxisoma, el cual sería incapaz de dividirse. Las células con peroxisomas dañados, darían lugar a células con deficiencia peroxisomal.
2. La peroxisomicina A1 podría afectar a la información genética relacionada con la maquinaria encargada de la síntesis de proteínas peroxisomales. Este daño podría causar ausencia total o parcial, o disfunción total o parcial de alguna(s) proteína(s) necesaria(s) para la adecuada formación de nuevos peroxisomas (por fisión de peroxisomas preexistentes). El daño podría traducirse en la producción de i) células deficientes en peroxisomas o ii) células con peroxisomas anormales debido a la incorporación de proteínas alteradas a los nuevos peroxisomas.

**POSIBLE MECANISMO I
EFECTO DIRECTO SOBRE LA MEMBRANA
PEROXISOMAL**



**POSIBLE MECANISMO I I
EFECTO SOBRE EL GENOMA NUCLEAR**

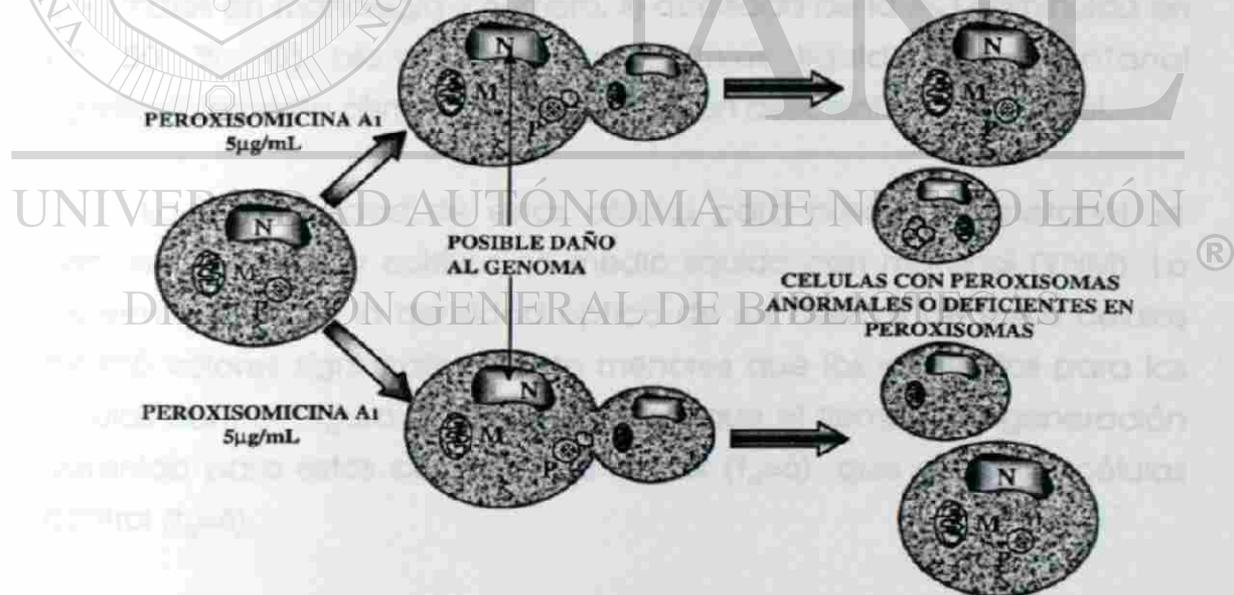


Figura 28. Esquema de los Mecanismos Posibles de Disfunción Peroxisomal Inducida por Peroxisomicina A1 sobre Células de *Hansenula polymorpha*. Se infiere que los experimentos deberán ser realizados bajo condiciones de cultivo en las cuales las células deberán presentar solo un peroxisoma. M, mitocondria; P, peroxisoma; N, núcleo.

Con base al esquema anteriormente expuesto, se realizaron cultivos de dos cepas de la levadura *Hansenula polymorpha* (CBS 4732 y NCYC *leu1-1*), en presencia de 5 µg/mL de peroxisomicina A1 y se aislaron dos cepas que presentaron incapacidad para crecer eficientemente en medio de cultivo sólido con metanol (agar YNM).

Las cepas aisladas se denominaron como células experimentales tipo I (células CEI) y células experimentales tipo II (células CEII). La incapacidad de estas cepas para crecer de manera eficiente en metanol, indicó de manera indirecta, que podría tratarse de una disfunción peroxisomal inducida por la peroxisomicina A1, por lo que ambas cepas se caracterizaron desde el punto de vista morfológico, fisiológico y bioquímico.

Las células CEI y las células CEII se cultivaron en medio con metanol y presentaron las siguientes características: I) peroxisomas anormales en morfología y número, II) actividad de la AO disminuida en un 50 %, III) biomasa en los cultivos líquidos con metanol significativamente disminuida y IV) utilización deficiente del metanol.

La incapacidad de estas células para crecer en metanol, se demostró al realizar cultivos en medio líquido con metanol (YNM). La determinación de la densidad óptica de los cultivos de estas células mostró valores significativamente menores que los obtenidos para las células control (figura 9), lo que explica que el tiempo de generación obtenido para estas células fuera mayor ($t_d=6$), que el de las células control ($t_d=4$).

Se observó que durante los cultivos líquidos, las células CEI y las células CEII se caracterizaron por la incapacidad para utilizar eficientemente el metanol (figura 9), sin embargo al cultivar las células bajo condiciones quimioestáticas (en mezcla glucosa/metanol), se demostró que estas células utilizaron ambos sustratos, ya que se

observó un incremento en la biomasa comparable a la del cultivo control (figura 15).

Estos resultados indican, muy probablemente, que los dos tipos de células utilizaron la glucosa como fuente de carbono y el metanol como una fuente adicional de energía. Lo anterior sugiere que: i) en estas células se lleva a cabo de manera eficiente la vía de desasimilación citosólica del formaldehído (figura 29), y que ii) el crecimiento de ambas cepas en cultivos líquidos con metanol como única fuente de carbono y energía, experimenta desventajas energéticas específicas, en particular en el catabolismo del metanol. Esas desventajas podrían estar más relacionadas con una disfunción peroxisomal que con otras fallas en el metabolismo intermediario del metanol.

Una probable explicación a estos resultados, podría estar relacionada con el papel de los peroxisomas en el metabolismo del metanol, que bajo condiciones normales está representado principalmente por tres eventos (figura 29): i) la oxidación inicial del metanol por la AO con la subsecuente producción de formaldehído y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ii) la descomposición del H_2O_2 por la catalasa y de manera muy importante, iii) la propiedad de la membrana peroxisomal en la regulación del flujo del formaldehído hacia la vía de la desasimilación, para la producción de energía, o hacia la asimilación, para la producción de biomasa.

PAPEL DE LOS PEROXISOMAS EN EL METABOLISMO DEL METANOL

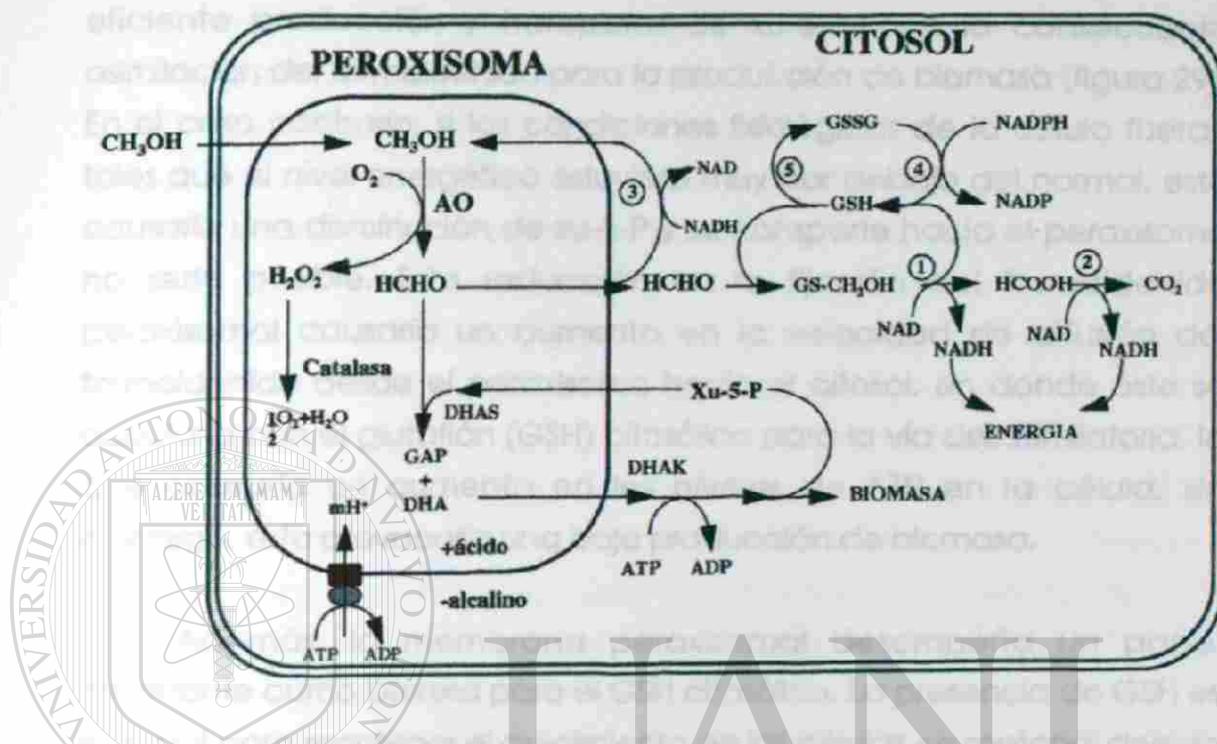


Figura 29. Representación Esquemática de la Compartimentalización y la Función de los Peroxisomas en el Metabolismo del Metanol en *Hansenula polymorpha*. 1. formaldehído deshidrogenasa, 2. formato deshidrogenasa, 3. formaldehído reductasa, 4. glutatión reductasa, 5. oxidación del glutatión.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Las propiedades de permeabilidad de la membrana peroxisomal se basan en la capacidad de la membrana para impedir el flujo libre de ciertos compuestos como la xilulosa-5-P (xu-5-P)⁶³, por lo que sería esencial la presencia de un gradiente de pH a través de la membrana^{64,65}, lo que permitiría el transporte de xu-5-P desde el citosol hacia la matriz peroxisomal.

La distribución del formaldehído hacia cualquiera de las dos vías (asimilación/desasimilación) depende del estado energético de las células. Con base a lo anterior, es de importancia considerar que en relación al estado energético de la células, se pueden presentar dos

posibilidades: 1). Una posibilidad sería aquella en la que si los niveles de ATP citosólico fueran adecuados, se mantendría una fuerza motriz de protones a través de la membrana peroxisomal, lo que permitiría la eficiente producción y transporte de xu-5-P, con la consecuente asimilación del formaldehído para la producción de biomasa (figura 29). En el caso contrario, si las condiciones fisiológicas de la célula fueran tales que el nivel energético estuviera muy por debajo del normal, esto causaría una disminución de xu-5-P y su transporte hacia el peroxisoma no sería posible. Esta reducción en la fijación del formaldehído peroxisomal causaría un aumento en la velocidad de difusión del formaldehído desde el peroxisoma hacia el citosol, en donde éste se acoplaría con el glutatión (GSH) citosólico para la vía desasimilatoria, lo que causaría un aumento en los niveles de ATP en la célula, sin embargo, esto provocaría una baja producción de biomasa.

Además, la membrana peroxisomal desempeña un papel importante como barrera para el GSH citosólico. La presencia de GSH es esencial para mantener el crecimiento de las células en metanol debido a que el formaldehído, en su forma libre, no es sustrato para la formaldehído deshidrogenasa, sino su hemimercaptal, el S-hidroxi metilglutatión^{66,67} (GS-CH₂OH), y en esta forma no es accesible para la vía asimilatoria (reacción catalizada por la dihidroxiacetona sintasa)⁶⁴.

Es importante también precisar que, en condiciones normales, la degradación del H₂O₂ por la catalasa se debe realizar dentro del peroxisoma, de esta forma se previene que la degradación se lleve a cabo por medio de otros procesos (citocromo c peroxidasa o glutatión peroxidasa) que consumen más energía, lo que provoca una reducción de la biomasa⁵⁶.

La caracterización de las células CEII y células CEII durante los cultivos con metanol sugirió que la disfunción peroxisomal podría

estar relacionada en parte, con una posible alteración en la membrana peroxisomal. Lo anterior se fundamenta en la aberración morfológica de los peroxisomas que se observó en estas células, y resultó más convincente al observar alrededor de los peroxisomas membranas pre-autofágicas, que posteriormente se fusionaron con la vacuola, en donde ocurrió la degradación de los organelos. La degradación de peroxisomas se observó después de 8 hrs. de cultivo en metanol, tiempo en el que los peroxisomas se multiplicaron y también aumentaron de tamaño, sin embargo, se demostró que en particular los peroxisomas grandes y maduros fueron sujetos a degradación, observándose con frecuencia células que contenían algunos peroxisomas relativamente pequeños en conjunto con uno o pocos peroxisomas grandes en diferentes estados de degradación. La degradación peroxisomal se observó con mayor frecuencia después de 12 hrs. de cultivo en metanol, lo que ocasionó a mayores tiempos de cultivo una desorganización celular generalizada que finalmente provocó la muerte celular.

Estas observaciones permitieron apoyar la hipótesis de la disfunción peroxisomal, ya que si la membrana peroxisomal es anormal será incapaz de balancear de manera adecuada el flujo del formaldehído, y en coincidencia con las observaciones mencionadas anteriormente, el formaldehído se acoplaría al glutatión (GSH) para formar S-formilglutatión. Este último, como ya se expuso, no es sustrato para la DHAS, por consiguiente, si existiera una pequeña cantidad de formaldehído libre, éste se utilizaría para la vía de la asimilación (producción de biomasa). Por el contrario, el S-formilglutatión es sustrato para la vía de la desasimilación, lo que resultaría en la generación de NADH y este se utilizaría para la producción de ATP por la vía mitocondrial. Esto podría explicar en parte la capacidad disminuida de las células CEI y de las células CEII para utilizar el metanol como única fuente de carbono y energía.

En el cultivo quimiostático para células CEI y células CEII, también se observó una elevada tasa de recambio peroxisomal, por consecuencia, las células contenían un número menor de peroxisomas, lo que coincidió con la disminución en la actividad específica de AO ($2.2 \text{ Umg} \cdot \text{proteína}^{-1}$) que se determinó en los extractos (ELC). Estos hallazgos, coinciden con los obtenidos por Titorenko y cols.^{69,70} en estudios realizados en células mutantes deficientes en la utilización de metanol (Mut⁻), en particular en células mutantes *pss⁻*. Estas células se caracterizan por presentar anomalías en la morfología peroxisomal, lo que causa que en los cultivos con metanol se observe una elevada tasa de recambio de los peroxisomas en estas células mutantes. Titorenko y cols. sugieren que la disfunción peroxisomal de las células mutantes *pss⁻* muy probablemente se debe a un defecto en las propiedades de transporte de la membrana peroxisomal, en particular, a la pérdida de la fuerza motriz de protones a través de la membrana, ya que se demostró que todas las enzimas involucradas en el metabolismo del metanol estaban presentes y activas en su sitio correcto, es decir dentro del peroxisoma, sin embargo se observó una elevada tasa de recambio peroxisomal.

Van der Klei y cols.⁷¹ obtuvieron una respuesta similar después de que cultivaron células de *H. polymorpha* en metanol y posteriormente se incubaron en presencia de iones cianuro, en donde se observó degradación de peroxisomas. Los autores sugieren que los iones cianuro provocan la inactivación irreversible de la AO, ya que al transferir las células que estuvieron en presencia de cianuro, a medio con metanol en ausencia de cianuro, se observó degradación de los peroxisomas que contenían AO inactiva, observándose de manera simultánea desarrollo de nuevos peroxisomas (por fisión de los peroxisomas no afectados).

Las observaciones anteriores sugieren que la degradación de peroxisomas es un proceso que requiere de un control muy preciso⁷² y que las señales que inician el proceso de recambio de peroxisomas, no están dirigidas contra las proteínas de matriz, sino hacia la membrana peroxisomal⁶⁶. Los autores suponen que este sistema de traducción de señales provee a las células la capacidad para identificar a los peroxisomas que deben ser degradados.

Lo anterior sugiere que la elevada tasa de recambio peroxisomal observada en las células experimentales podría atribuirse a la morfología aberrante que estos organelos presentan, y podría explicar los valores disminuidos en la actividad de la AO obtenidos en los cultivos. Además, estos hallazgos coinciden con los descritos por van der Klei y cols., lo que sugiere que probablemente en las células experimentales la degradación no está dirigida en contra de la AO, ya que se demostró por citoquímica, que los peroxisomas tanto intactos como aquellos en proceso de degradación contenían AO activa.

Por otro lado, el análisis genético reveló que ambas cepas afectadas, no se complementan entre ellas. Esto no necesariamente significa que el defecto en ambas cepas es recesivo y en diferentes genes, aunque es la explicación más adecuada a los resultados obtenidos, los que coinciden con los obtenidos por Titorenko y cols.^{69,70}. Estos investigadores observaron que las mutaciones en diferentes alelos de los mismos genes en células mutantes deficientes de peroxisomas, no se complementaban entre ellas, y concluyeron que se debía a que las células mutantes presentaban diferentes frecuencias de recombinación.

Debido a que en el presente trabajo solamente se obtuvieron dos colonias Mut⁻ (deficientes en la utilización del metanol) después de la exposición a la peroxisomicina A₁, esta baja frecuencia podría interpretarse como un evento que representa mutaciones espontáneas.

A este respecto, el genoma de las cepas de *Hansenula polymorpha* que se utilizaron, tienen la característica de ser muy estables, y la probabilidad de que se presenten mutaciones es muy escasa, bajo condiciones normales de laboratorio.

Por otro lado, es importante mencionar que existe en la literatura por lo menos un reporte en el que se demuestra que un medicamento con estructura que presenta ciertas semejanzas con la estructura de la peroxisomicina A1, es capaz de afectar la proliferación peroxisomal en células de levadura⁷³. La adriamicina (*clorhidrato de doxorubicina*; ADRIAMYCIN, RUBREX) es un antibiótico antraciclínico que se cuenta entre los agentes antitumorales más importantes. Este medicamento posee una estructura anular tetraciclínica con fracciones de quinona e hidroxiantraquinona en anillos vecinos, lo que la hace tener cierta semejanza estructural con la peroxisomicina A1. Keyani y cols. sugieren que la adriamicina causa una mutación en la maquinaria de proliferación peroxisomal. Por lo tanto, no se puede descartar la posibilidad de que la peroxisomicina A1 tenga la capacidad de causar un efecto mutagénico sobre células de levadura. En este sentido, solamente se puede especular que el crecimiento lento irreversible que presentaron las células CE1 y CE2 durante los cultivos en metanol podría atribuirse a que la peroxisomicina A1 probablemente causó una mutación. Esta mutación podría inducir la sobreexpresión (o represión) de un gen específico que tendría la capacidad de causar que las células experimentales presenten una alta resistencia a la peroxisomicina A1. El fenotipo de resistencia a multidroga debido a la sobreexpresión de ciertos genes ha sido ampliamente documentado⁷⁴. Se ha descrito una amplia red de genes de levaduras involucrados en este fenómeno. Esta red de genes pertenecen a la superfamilia del cassette de unión a ATP que funcionan como una bomba de flujo de medicamentos. Uno de estos genes, el PAL1, codifica para una proteína esencial para la función peroxisomal⁷⁵.

Con base al esquema que se presenta en la figura 28, la información obtenida en este trabajo, permite sugerir que la disfunción peroxisomal de las células experimentales, no es producto de un daño directo a la membrana peroxisomal (mecanismo I), ya que no se obtuvieron células con deficiencia total de peroxisomas. Es importante señalar que los experimentos se llevaron a cabo bajo estrictas condiciones de cultivo en las cuales las células presentaron un solo peroxisoma. Con lo anterior no se descarta totalmente el primer mecanismo, debido a que al incubar células en presencia de peroxisomicina A₁, se observó en algunas células fragmentación de la membrana peroxisomal (figura 4 y figura 18) similar a la reportada por Sepúlveda y cols.²⁰. Este hallazgo, sugiere que el daño selectivo e irreversible sobre la membrana peroxisomal, es un evento reproducible y además confirma que el peroxisoma es el organelo blanco de la peroxisomicina A₁ en células de levadura.

Las cepas con disfunción peroxisomal inducida por la peroxisomicina A₁, aisladas y caracterizadas en este trabajo constituyen un organismo modelo para realizar diferentes estudios relacionados con la biogénesis y la función peroxisomal.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 5

CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES

5.1 CONCLUSIONES

1. Se acepta la hipótesis de trabajo propuesta:

“Si el daño producido por la peroxisomicina A1 sobre la integridad peroxisomal a una dosis no letal fuera irreversible, sería posible obtener células con disfunción peroxisomal.”.

2. El daño selectivo e irreversible sobre la membrana peroxisomal en levaduras inducido por la peroxisomicina A1, es un evento reproducible y confirma que el peroxisoma es el organelo blanco de la peroxisomicina A1 en células de levadura.

3. Se aislaron dos cepas de *Hansenula polymorpha* con disfunción peroxisomal después de incubar células en presencia de una dosis de peroxisomicina A1 de 5 µg/ml de cultivo.

4. Los datos obtenidos en este trabajo indican que la disfunción peroxisomal probablemente fue producto de un daño al genoma de las células, sin embargo:

5. No se descarta la posibilidad de que la peroxisomicina A1 cause disfunción peroxisomal por daño directo a la membrana peroxisomal.

5.2 PERSPECTIVAS

Las cepas aisladas en este trabajo representan un organismo modelo para realizar los siguientes estudios:

1. Obtención de información sobre el mecanismo de acción de la peroxisomicina A₁ sobre los peroxisomas.
2. Caracterización molecular de la disfunción peroxisomal de las células CEI y CEII.
3. Análisis del efecto de compuestos relacionados estructuralmente con la peroxisomicina A₁ sobre las células CEI y CEII.
4. Investigación sobre la capacidad mutagénica de la peroxisomicina A₁ en levaduras.

5.3 CONTRIBUCIONES

Las cepas aisladas en este trabajo se utilizaron para realizar estudios en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Groningen, Holanda. En estos estudios se aisló un fragmento genómico que es capaz de complementar la incapacidad de las células CEII para crecer en metanol, devolviéndole la capacidad de formar peroxisomas normales tanto en número como en morfología (Vargas, Z. R. y cols. 1998, *Toxicon*, en prensa).

BIBLIOGRAFIA

1. Fernández, Nava R. (1989). El género *Karwinskia* Zucc. (Rhamnaceae) en México. Tesis de M. en C. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México., D.F. 89 p.
2. Clavijero, F. X. (1982). Plantas Nocivas y Extravagantes. En: Manuel León Portilla (Ed.), Historia de la Antigua o Baja California. Editorial Porrúa 3er ed., pp 31-33
3. Castillo, Nájera F. (1920). Contribución al estudio de la parálisis tóxica. Un envenenamiento colectivo con tullidora. en: F. Castillo-Nájera (De), Memorias del V Congreso Médico Mexicano. Dirección de Talleres Gráficos 1. pp. 240-244.
4. Padrón, Puyou F. (1951). Estudio Clínico experimental por *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) en niños. Gac. Méd. Méx. 81, 299-311.
5. Del Pozo, E. (1965). Los efectos paralizantes de la Tullidora. Estudios clínicos y Experimentales. Gac. Méd. Méx. 95, 179-182.
6. Escobar, A., and Nieto, D. (1965). Aspectos Neuropatológicos de la Intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio Experimental. Gac. Méd. Méx. 95, 163-177.
7. Puertolas, M., Nava, O., Medina, H., López, F. and Oyervides, J. (1984). Poliradiculoneurosis por *Karwinskia humboldtiana* Rev. Méd. I.M.S.S. (México), 22, 25-31.
8. Dewan, N.L., Henson, J.B., Dollahit, J.W. and Bridges, C.H. (1964). Toxic myo-degeneration in goats produced by feeding mature fruits from the coyotillo plant (*Karwinskia humboldtiana*) Pathol. Vet. 46, 215-226.
9. Charlton, K. and Pierce, K. (1970). Neuropathy in goats caused by experimental coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) I Poison. Pathol. Vet. 7, 385-407.
10. Usková, D., Ruiz, O.J., Lux, A. and Piñeyro, L.A. (1994). Tissue culture of *Karwinskia humboldtiana* -a plant producing toxins with antitumoural effects. Plant cell, Tissue and Organ Culture 36. 339-343.
11. Dreyer, D., Aral, I., Bachman, C., Anderson, W. R., Smith, R., Daves, G.D. (1975). Toxins causing noninflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. J. Am. Chem. Soc. 97, 4895-4990
12. Waksman, N. and Ramírez, R. (1992). Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia humboldtiana*. Rev. Latinoamer. Quím. 23/1 y 22/24, pp. 25-27.

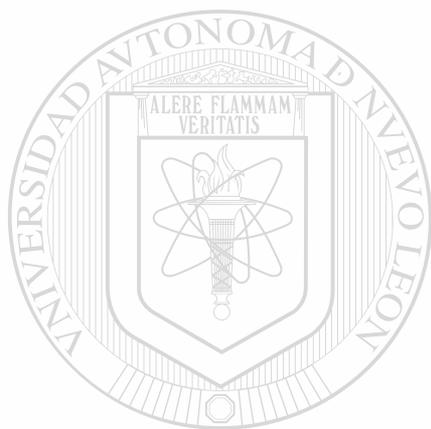
13. Rivas, V., Torres, R. and Waksman, N., (1990). Dimeric anthracenones from *Karwinskia* species. *Planta Medica*, 56, pp 562
14. Bermúdez, M. V., González -Spencer, D., Guerrero, M., Waksman, N., and Piñeyro, A. (1986). Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). *Toxicon* 24, pp 1091-1097
15. Bermúdez, M., Martínez, F., Salazar, M., Waksman, N. and Piñeyro, A. (1992). Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora) in rat, guinea-pig, hamster and dog. *Toxicon* 30, pp. 1493
16. Piñeyro, L.A. (1990). Toxicidad selectiva in vitro de la toxina T514 de la *Karwinskia humboldtiana*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. UANL. Monterrey, N.L. México.
17. Loomis, T. (1978). Numbers in Toxicology. In: T. Loomis, (De), *Essentials of Toxicology*, Lea and Febiger, Philadelphia, 2, pp. 13-28.
18. Piñeyro, A., Martínez de Villarreal, L. and González, R. (1994). In vitro selective toxicity of toxin T 514 from *K. humboldtiana* (Buckthorn) plant on various human tumor cell lines. *Toxicology*. 92, 227-227.
19. Lazarow, P. B. (1988). Peroxisomes. In: *The Liver: Biology and Pathology*. 2nd. edn. I.M. Arias, W.B. Jakovy, H. Popper, D. Schachter and D.A. Shafritz (Eds.). Raven Press Ltd., New York. pp 241-254.
20. Sepúlveda, J. S., van der Klei, I. J., Keizer, I., López, A. P., Harder, W. and Veenhuis, M. (1992). Studies on the effect of toxin T-514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *FEMS. Microbiol. Lett.* 91, 207-212.
21. Moreno, S.M., Vargas, Z.R., Esquivel, E.D., Waksman, N., and Piñeyro, L.A. (1995). Effect of peroxisomolne and related anthracenones on catalase activity. *Planta Med.* 61 (4), pp. 337-340.
22. Moreno, S.M., Vargas, Z.R., Ballesteros, E.R., Piñeyro, L.A. and Sepúlveda, S.J. (1997). Studies on the effect of peroxisomolne on catalase activity in albino mice . *Toxicon* 35 (4), pp 777-783.
23. Rhodin, J. (1954). Correlation of Ultrastructural Organization and Function in Normal and Experimentally Changed Proximal Tubule Cells of the Mouse Kidney. Thesis, Karolinska Institutet.
24. Rouiller, C., and Bernhard, W. (1965). "Microbodies" and the problem of mitochondrial regeneration in liver cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2 (Suppl.), pp. 355-359.
25. De Duve, C., and Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.*, 46, pp. 323-357.
26. Fahimi, H.D. and Sies, H. (1987). In: *Peroxisomes In Biology and Medicine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
27. van den Bosch, H., Schutgens, R.B.H., Wanders, R.J.A. and Tager, J.M. (1992). Biochemistry of peroxisomes *Annu. Rev. Biochem.* 61, pp. 157-197.
28. Müller, W.M., van der Krift, T.P., Krouwer, A.J.J., Wösten, H.A.B., van der Voort, L.H.M., Smaal, E.B. and Verkleij, A.J. (1991). Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *EMBO J.* 10, pp. 489-495.

29. Harder, W. and Veenhuis, M. (1989). Metabolism of one-carbon compounds, p.289-316 In: A.H. Rose and J.S. Harrison (Ed.), *The Yeasts*, volumen3 (segunda edición). Academic Press London.
30. Lazarow, P.B. (1984). The peroxisomal membrane. In: Bittar EE (ed) *Membrane structure and function*, vol 5. John Wiley and Sons Inc., pp 1-31.
31. Usuda, N., Yokota, S., Ichikawa, R., Hasimoto, T. and Nagata, T.(1991). Immunoelectron microscopic study of a new D-amino acid oxidase-immunoreactive subcompartment in rat liver peroxisomes, *J Histochem Cytochem*, 39, pp. 95-102.
32. Baudhuin, P., Beaufay, H. and de Duve, C.(1965). Combined biochemical and morphological study of particulate fractions from rat liver, *J Cell Biol*, 26, 219-243.
33. Völkl, A., Baumgart, E. and Fahimi, H. D. (1988). Localization of urate oxidase in the crystalline cores of rat liver peroxisomes by immunocytochemistry and immunoblotting. *J Histochem Cytochem*. 36, 329-336.
34. Veenhuis, M., van Dijken, J.P., and Harder, W. (1983). The significance of peroxisomes in the metabolism of one carbon compounds in yeasts. *Adv. Micro. Biol. Physiol.* 24, 1-82.
35. Hruban, Z., and Rechcigl, M. (1969). *Microbodies and Related Particles*. Academic Press, New York.
36. Brewer, J.M., Pesce, A.J. and Spencer, T.E. (1974). Ultracentrifugación. In: *Experimental Techniques in Biochemistry* (Brewer, Pesce, and Ashworth). Prentice-Hall, Inc. London, pp 161.
37. Rickwood, D. (1984). Isolation of Subcellular Organelles and Membranes. En: *Centrifugation-2nd Edition- a practical approach*. IRL Press Limited, Oxford, England. pp 161.
38. Lazarow, P. B. and Fujiki, Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 1, 489-530.
39. Glaumann, H., Ericsson, J.L.E., Mazarella, L. (1980). Mechanisms of intralysosomal degradation with special reference to autophagocytosis and heterophagocytosis of cell organelles. *Int Rev. Cytobiol*, 73, 149-182.
40. Veenhuis, M., Douma, A.C., Harder, W., and Osumi, M. (1983). Degradation and turnover of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha* induced by selective inactivation of peroxisomal enzymes. *Arch Microbiol*. 134, 193-203.
41. Poole, B., Higashi, T., and de Duve, C. (1970). The synthesis and turnover of rat liver peroxisomes. III. The size distribution of peroxisomes and the incorporation of new catalase. *J. Cell Biol*, 45, 408-415.
42. Wanders, R. J. A., H. S. A. Heymans, R. B. H. Schutgens, PG. Barth, H. van den Bosch, J. M. Tager (1988). Peroxisomal disorders in neurology. *J. Neural. Sci.* 88, 1-39.
43. Moser, H.W., and Goldfischer. S.L. (1985). The peroxisomal disorders. *Hosp. Pract.* 20, 408-415.
44. Veenhuis, M. (1992). Peroxisome biogenesis and function in *Hansenula polymorpha*. *Cell Biochem and Function*. 109, 175-184.42.

45. Faber, K., Swaving, G., Faber, F., A.B., G., Harder, W., Veenhuis, M. and Haima, P. (1992). Chromosomal targeting of replicating plasmids in the yeast *Hansenula polymorpha*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2405-2416.
46. Veenhuis, M., van Dijken, J.P., Pilon, S.A.F. and Harder, W. (1978). Development of crystalline peroxisomes in methanol-grown cells of the yeast *Hansenula polymorpha* and its relation to environmental conditions. *Arch. Microbiol.* 117, 153-163.
47. Veenhuis, M., and Harder, W. (1989). Occurrence, proliferation and metabolic function of yeast microbodies. *Yeast* 5, 517-524.
48. Veenhuis, M., and Harder, W. (1990). Yeast microbodies: their substructure, biogenesis and turnover in relation to environmental conditions. In: A.H. Rose and J. S. Harrison eds. *Yeast*, 2nd Edition vol IV(2)p 601.653, Academic Press Ltd., London, New York, San Diego.
49. Weibel, E. R. and Bolender, P. (1976). Stereological techniques for electron microscopic morphometry. In: Principles and techniques of electron microscopy (M. A. Hayat, ed.) London: Van Nostrand Reinhold.
50. Veenhuis, M. (1988). Yeast microbodies PhD Thesis, University of Groningen, The Netherlands.
51. Tikhomirova, L.P., Ikonomova, R.N. and Kuznetsova, E.N. (1986). Evidence for autonomous replication and stabilization of recombinant plasmids in the transformants of the yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr. Genet.* 10, 741-747.
52. Gleson, M.A. and Soudbery, P.E. (1988). Genetic Analysis in the Methylotrophic Yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast*, 4, 293-303.
53. Erdmann, R., Veenhuis, M., Mertens, D. and Kunau, W.-H. (1989). Isolation of peroxisome-deficient mutants of *Sacharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 5419-5423.
54. Cregg, J. M., van der Klei, I. J., Sulter, G. J., Veenhuis, M. and Harder, W. (1990). Peroxisome deficient mutants of *Hansenula polymorpha*. *YEAST*, 6, 87-97.
55. Liu, H., Tan, X., Veenhuis, M., McCollum, D. and Cregg, J. M. (1992). An efficient screen for peroxisome-deficient mutants of *Pichia pastoris*. *J. Bacteriol.* 174, 4943-4951.
56. van der Klei, I.J., Harder, W. and Veenhuis, M. (1991). Methanol metabolism in a peroxisome-deficient mutant of *Hansenula polymorpha*: a physiological study. *Arch. Microbiol.* 156, 15-24.
57. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
58. Verduyn, C., Gulseppin, M. L. F., Scheffers, W. A. and van Dijken, J. P. (1988). Hydrogen peroxide metabolism in yeasts *Appl. Environm. Microbiol* 54, 2086-2090.
59. Lück, H. (1963). Catalase. In: "Methods of enzymatic analysis" (Bergmeijer, H. U., ed.), pp. 885-894, Acad. Press, London/New York.

60. Veenhuis, M., van Dijken, L.P. and Harder, W. (1976). Cytochemical studies on the localization of methanol oxidase and other oxidases in peroxisomes of methanol grown *Hansenula polymorpha*. Arch. Microbiol. 111, 123-135.
61. Slot, J.W. and Geuze, H.J. (1984). Gold markers for single and double immunolabeling of ultrathin cryosections. In: "Immunolabeling for electron microscopy: (Polak, J.M., Varndell, J.M. eds.), pp. 129-142, Elsevier Sci. Public., Amsterdam.
62. Boeke, J.D., LaCroute, F. and Fink, G.R. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. Mol. Gen. Genet. 197, 345-346.
63. Harder, W., Trotsenko, Y. A., Bystrykh, L. V. and Engli, T. (1987). Metabolic regulation in methylotrophic yeasts. In: van Verseveld, H. W. and Duine, J. A. (eds.) Microbial growth on C₂ compounds. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands pp 139-149.
64. Nicolay, K., Veenhuis, M., Douma, A.C. and Harder, W. (1987). A ³¹P NMR study of the internal pH of yeast peroxisomes. Arch. Microbiol. 147, 37-41.
65. Waterham, H. R., Keizer-Gunnink, I., Goodman, J. M., Harder, W. and Veenhuis, M. (1990). Immunocytochemical evidence for the acidic nature of peroxisomes in methylotrophic yeasts. FEBS Lett. 262, 17-19.
66. Schütte, H., Flossdorf, J., Sahm, H. and Kula, M.R. (1976). Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. Eur. J. Biochem. 62, 151-160.
67. Allais, J. J., Louktibi, A. and Baratti, J. (1983). Oxidation of methanol by the yeast, *Pichia pastoris*, purification and properties of formaldehyde dehydrogenase. Agric. Biol. Chem. 47, 1509-1516.
68. Bystrykh, L. V., de Koning, W. and Harder, W. (1990). Dihydroxyacetone synthase from *Candida boidinii* KD 1. In: Lindstrom, M. E. (ed.) Meth. In Enzymol., Acad. Press Inc. Orlando Florida. vol. 188.
69. Titorenko, V. I., Waterham, H. R., Halma, P., Harder, W. and Veenhuis, M. (1992). Peroxisome biogenesis in *Hansenula polymorpha* : different mutations in genes, essential for peroxisome biogenesis, cause different peroxisomal mutant phenotypes. FEMS. Microbiol. Lett. 95, 143, 148.
70. Titorenko, V. I., Waterham, H. R., Cregg, J. M., Harder, W. and Veenhuis, M. (1993). A complex set of interacting genes controls peroxisome biogenesis in *Hansenula polymorpha* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7470-7474.
71. van der Klei, I. J., Veenhuis, M., Nicolay, K. and Harder, W. (1989). In vivo inactivation of peroxisomal alcohol oxidase in *Hansenula polymorpha* by KCN is an irreversible process. Arch. Microbiol 151, 26-33.
72. Titorenko, V. I., Harder, W. and Veenhuis, M. (1995). Isolation of peroxisome-degradation-deficient mutants of *Hansenula polymorpha*. J. Bacteriol. 177, 357-363.

73. Keyhani, E. and Keyani, J. (1980). Peroxisome proliferation in adriamycin treated yeast during the recovery phase. In: Electron Microscopy, pp. 86-87. (Brederoo, P. and Priester, W., Eds.). Volume 2.
74. Balzi, E. and Goffeau, A. (1995). Yeast multidrug resistance: the PDR network. *J. Biol. Membr.* 27 (1), 71-76.
75. Swartzman, E. E., Viswanathan, N. and Thorner, J. (1996). The PAL1 gene product is a peroxisomal ATP-binding-cassette transporter in the yeast *Sacharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* 134 (4), 549-563.
80. van Uden, N.. (1971). In: Kinetics and Energetics of Yeast Growth: The Yeast. Physiology and Biochemistry of Yeasts. Vol 2. Ed. Antony H. Rose y J.S. Harrison, Academic Press.London and New York.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Rigoberto Vargas Zapata

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Morfología

Título de Tesis: OBTENCION Y CARACTERIZACION DE CELULAS DE LEVADURA CON DISFUNCION PEROXISOMAL INDUCIDA POR LA PEROXISOMICINA A₁

Area de Estudio: Morfología

Biografía:

Datos personales: Nacido en Mier y Noriega, Nueva León, el 9 de Julio de 1966, hijo del Profesor Miguel César Vargas Urbina y Cándida Zapata García.

Escolaridad: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el título profesional de Químico Clínico Biólogo en 1988.

Experiencia Profesional: Personal Profesional de Tiempo Completo de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 1989, Instructor del curso de prácticas de laboratorio de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina desde 1991, Instructor del Laboratorio de Histología del curso de Anatomía Microscópica de la Facultad de Medicina desde 1996, 23 trabajos de Investigación presentados en congresos Nacionales, Latinoamericanos e Internacionales, Estudiante Distinguido del Doctorado en Ciencias con especialidad en Morfología en 1993, Premio de Investigación en el área de Ciencias Naturales en 1995, Estancia de Investigación para realizar Tesis *in absentia* en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Centro de Biología de la Universidad de Groningen, Holanda, Candidato a Investigador del Sistema Nacional de Investigadores desde 1998 .

APENDICE A

Métodos de Cultivo de Levaduras

a) Composición de los Medios de Cultivo.

YPD líquido: extracto de levaduras al 0.65 %

peptona 2 %

glucosa 1 %

YPD sólido: extracto de levaduras al 0.65 %

peptona 2 %

glucosa 1 %

bacto agar 2 %

MM: medio mineral, cada litro contiene:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.5 g

Na_2HPO_4 0.35 g

Trazas minerales (solución de Vishniac) 0.5 mL;

solución madre:

EDTA 10 g

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.4 g

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.01 g

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.32 g

$\text{CuSO}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.315 g

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg

$(\text{NH})_4\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.22 g

CaCl_2 1.42 g

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g

extracto de levaduras 0.25 g

vitaminas 1 mL; solución madre 1000X

Acido Pantoténico (Ca)	400 mg	(Merck)
Acido Fólico	2 mg	(Sigma)
Myo Inositol	200 mg	(Sigma)
Nicotinamida	400 mg	(Sigma)
Acido p-Aminobenzóico	200 mg	(Sigma)
Riboflavina	200 mg	(Sigma)
Tiamina	400 mg	(Sigma)
Piridoxina	400 mg	(Brocacef)

YNX líquido: medio mineral adicionada con uno de los siguientes substratos como fuentes de carbono y/o nitrógeno:

YND: glucosa 0.5 % (p/v)/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 % (p/v)

YNM: metanol 0.5 % (v/v)/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 % (p/v)

YNE: etanol 0.5 % (v/v)/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 % (p/v)

YNMe: glucosa 0.5 % (p/v)/ metilamina 0.25 % (p/v)

YNG: glicerol 0.5 % (v/v)/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 % (p/v)

Para los medios YNX sólidos se adicionó bacto agar al 2 %.

Para los cultivos de *Hansenula polymorpha* leu 1-1, se adicionó L-leucina (Merck) a una concentración final de 30 mg/L.

Para el análisis de complementación se utilizaron los siguientes

medios: EM; extracto de malta 6 % y agar al 2 %, YND o YNM con y sin uracilo o leucina (medios selectivos).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Medio de Cultivo Quimioestático.

Cada litro contiene:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	20 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}$	0.35 g
extracto de levaduras	10 g
trazas minerales	10 mL
vitaminas:	10 mL solución madre 1000X:

Biotina	1 mg
Tiamina	30 mg
Amortiguador de fosfatos 10 mM	10 mL
glucosa	0.25 % (p/v), solución madre 25 %
Metanol	0.3 % (v/v), solución madre 50 %

b) Condiciones de Esterilización de los Medios de Cultivo.

medios para cultivos líquidos: 1 atm de presión durante 15 min., en una olla de presión (Presto).

medios para cultivo quimiostático: 1 atm de presión durante 45 min. en un autoclave (van Rietschoten en Houwen).

Para preparar las soluciones madre el metanol y etanol, así como las vitaminas se esterilizaron por filtración, y las soluciones madre de glucosa, glicerol y metilamina, por autoclave.

c) Determinación del Crecimiento Exponencial.

Una población de células genéticamente idénticas, dispersadas homogéneamente en un medio líquido apropiado para su crecimiento, toman nutrientes y los procesan mediante procesos de transporte y reacciones enzimáticas con la producción de calor, productos de deshecho, compuestos de alta energía, producción de unidades micro- y macromoleculares para la formación de estructuras celulares. Esto permite a la célula crecer, dividirse y multiplicarse⁸⁰.

La tasa o velocidad de este proceso se calcula al medir el cambio de la densidad de población con respecto al tiempo:

$$v = dx/dt$$

Si se divide la velocidad instantánea por la densidad de población instantánea, se obtiene la velocidad de crecimiento específico de ese momento:

$$m_g = (1/x) \cdot (dx/dt)$$

Si el medio mantiene constantes las propiedades químicas y físicas, la velocidad de crecimiento específico no varía con el tiempo, entonces se incrementan los constituyentes de la biomasa con la misma velocidad. Estas condiciones de crecimiento de la población se denomina "crecimiento balanceado y exponencial".

$$m_g \cdot x = dx/dt$$

integrando, se obtiene la conocida expresión para el incremento de población durante el crecimiento exponencial:

$$x_t = x_0 \cdot e^{m_g t}$$

Tomando los logaritmos de ambos lados se linealiza la ecuación:

$$\log x_t = \log x_0 + m_g t$$

Si se grafican los logaritmos de los valores obtenidos de la densidad de población contra el tiempo, se obtiene una serie de puntos por los cuales se puede trazar una línea recta cuya pendiente, después de dividirse por el $\log e$, es un estimado de la velocidad de crecimiento específico.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

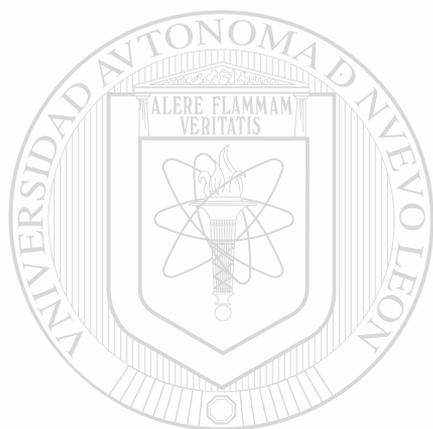
La relación entre el crecimiento específico y la concentración de un nutriente esencial que limita la velocidad de crecimiento esta dada por la ecuación:

$$m_g = YQS$$

en donde Y representa el factor de "producción", es decir la relación entre la biomasa formada y el nutriente limitante consumido, S es una función de la concentración del nutriente en el medio y Q representan factores definidos por el estado fisiológico de la población. Es decir que cualquier cambio en la velocidad de crecimiento estará influenciada por alteraciones en cualquiera de estos factores.

d) Control de Calidad de los Cultivos.

Para detectar posibles contaminaciones en los cultivos realizados, se tomaron alícuotas de cada uno de ellos y se colocaron en laminillas para observar al microscopio de luz. La detección de cualquier tipo de contaminante causó el cese y eliminación del cultivo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APENDICE B

Técnicas de Inclusión en Resina Epóxica para Microscopía Electrónica de Transmisión.

1. Se examinó la muestra al microscopía de luz para verificar si no había contaminación.
2. La muestra se colocó en un tubo eppendorf, se centrifugó, decantó y se lavó con agua corriente.
3. Se fijó con KMnO_4 al 1.5 % durante 20 a 40 min. a temperatura ambiente.
4. Se centrifugó, se lavó con agua corriente, o hasta que el sobrenadante fue incoloro.
5. Se contrastó con acetato de uranilo al 1 % por una hora o durante toda la noche.
6. Se deshidrató en etanol: Método rápido de deshidratación en horno de microondas.

1- 50 % v/v por 5 min.

2- 70 % v/v por 5 min.

3- 96 % v/v por 5 min.

4- 100 % v/v por 5 min.

5- 100 % v/v por 10 min.

7. Se aclaró en óxido de propileno por 15 min.
8. Se preincluyó en mezclas 1:1 y 3:1 de epon:óxido de propileno por 20 min. cada uno en horno de microondas o una hora a temperatura ambiente.
9. Se incluyó en resina epóxica pura por 20 min. (dos veces) en horno de microondas (o una hora a temperatura ambiente).
10. Las muestras incluidas en cápsulas de plástico se colocaron en una estufa durante toda la noche a 60°C para su polimerización.

11. Se hicieron cortes finos con una cuchilla de diamante en un ultramicrotomo LKB.
12. Los cortes se montaron en rejillas de cobre, se observaron y fotografiaron al microscopio electrónico Phillips EM 300.

Obtención de Esferoplastos y Técnica de Inclusión para Microscopía Electrónica.

a) Obtención de esferoplastos.

- 1- Un volumen de células equivalente a 20 DO por mL se centrifugó y lavó con agua y posteriormente con amortiguador sorbitol 3 M:

sorbitol	3 M
amortiguador de fosfatos	50 mM pH 7.5
MgCl ₂	1 mM
EDTA	1 mM

- 2- Se resuspendió y se incubó por 10 min. a temperatura ambiente en amortiguador A:

sorbitol	3 M
----------	-----

β-mercaptoetanol	0.2 M
------------------	-------

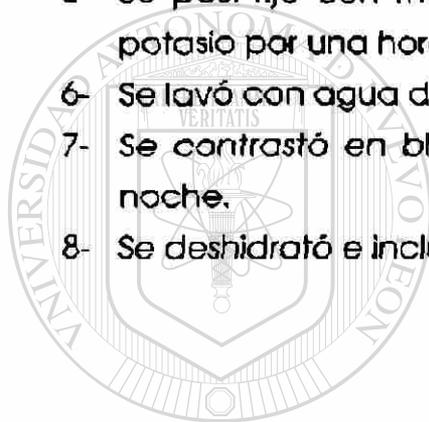
- 3- Se centrifugó, se lavó con amortiguador de sorbitol 3 M. ®
- 4- Se resuspendió y se incubó durante 30 a 60 min. a 37°C en amortiguador B pre calentado:

amortiguador	A
zymoliasa	1 mg/mL

- 5- Se observó al microscopio de luz la formación de esferoplastos.
- 6- El proceso se detuvo al colocar la muestra en hielo.

b) *Técnica de Inclusión para Microscopía Electrónica (para Esferoplastos).*

- 1- Los esferoplastos se fijaron con una gata de glutaraldehído al 50 % en solución C: cacodilato de sodio al 0.1M pH 6.
- 2- La muestra se centrifugó por 5-10 min., se decantó el sobrenadante y se lavó con amortiguador sorbitol 3 M.
- 3- Se centrifugó, resuspendió y se incubó en glutaraldehído al 6 % en solución D: cacodilato de sodio pH 7.2 a 4°C, por una hora.
- 4- Se lavó con solución D.
- 5- Se post-fijó con mezcla 1:1 de tetraóxido de osmio:dicromato de potasio por una hora a temperatura ambiente.
- 6- Se lavó con agua destilada.
- 7- Se contrastó en bloque con acetato de uranilo durante toda la noche.
- 8- Se deshidrató e incluyó por el método ya descrito.



UANL

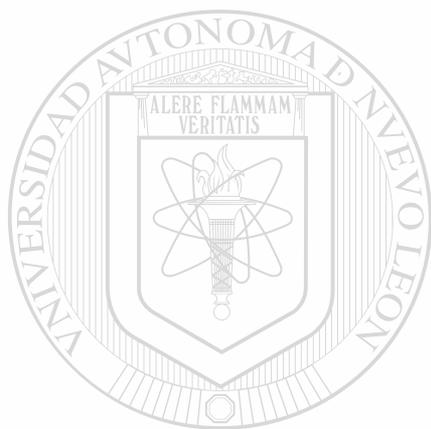
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APENDICE C

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral, se incluyeron en un artículo que ha sido aceptado para su publicación en la revista *Toxicon*.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Editor-in-Chief: Professor Alan Harvey
Department of Physiology and Pharmacology
University of Strathclyde
204 George Street
Glasgow
G1 1XW

May 12, 1998

Dr R.V. Zapata
Depto. de Farmacología y Toxicología
Facultad de Medicina, U.A.N.L.
Apt. Postal 146, Col. del Valle
Garza Garcia, NL
MEXICO

Tel 0141 553 4155
Fax 0141 552 8376
Email toxicoa@strath.ac.uk

Dear Dr Zapata

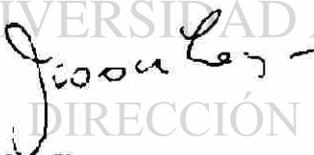
Manuscript number 97 150

R.V. Zapata, V.T. Gonzalez, J.S. Saavedra, A.P. Lopez, K.B. Rechinger, I. Keizer-Gunnink, J.A.K.W. Kiel and M. Veenhuis

**PEROXISOMICINE A1 (PLANT TOXIN-514) AFFECTS NORMAL
PEROXISOME ASSEMBLY IN THE YEAST HANSENULA POLYMORPHA**

I am pleased to tell you that your paper has been accepted for *Toxicol.* I have sent it to the publishers, and you should get proofs in due course.

Yours sincerely


Alan Harvey

YV

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

Peroxisomicine A1 (plant toxin-514) affects normal peroxisome assembly in the yeast *Hansenula polymorpha*.

*Rigoberto Vargas-Zapata¹, Vladimira Torres-González², Julio Sepúlveda-Saavedra³, Alfredo Piñeyro-López¹, Karl B. Rechinger⁴, Ineke Keizer-Gunnink⁵, Jan A.K.W. Kiel⁵ and Marten Veenhuis⁵

¹*Departamento de Farmacología-Toxicología,* ²*Departamento de Embriología y* ³*Departamento de Histología, Facultad de Medicina, U.A.N.L. Apdo. Postal 146 Col. del Valle, Garza García, N.L. México*

⁴*Carlsberg Laboratory, Department of Physiology, Gamle Carlsberg Vej 10, DK-2500 Valby, Copenhagen, Denmark*

⁵*Department of Microbiology, Biological Center, Groningen Biomolecular Science and Biotechnology Institute (GBB), University of Groningen, 9751 NN Haren, The Netherlands*

Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Apartado Postal 146, Col. del Valle, Garza García, N.L. , 66220 México.Fax: (528)348-7763.

* Author for correspondence

Rigoberto Vargas-Zapata, Vladimira Torres-González, Alfredo Piñeyro-López, Julio Sepúlveda-Saavedra, Karl B. Rechinger, Ineke Keizer-Gunnink, Jan A.K.W. Kiel and Marten Veenhuis. Peroxisomicine A1 (plant toxin-514) affects normal peroxisome assembly in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Toxicon* 44, 1001-1008, 2003.

ABSTRACT.

Previously we demonstrated that peroxisomicine A1 (T-514), a plant toxin isolated from *Karwinskia* species, has a deteriorating effect on the integrity of peroxisomes of methylotrophic yeasts. Here we describe two strains of *Hansenula polymorpha*, affected in the normal utilization of methanol as sole source of carbon and energy due to peroxisomicine A1 treatment. The two strains isolated (L17 and RV31) grew poorly on methanol, apparently due to malfunctioning of their peroxisomes. Moreover, the cells displayed a high peroxisome turnover rate. We argue that the peroxisomicine A1 induced phenotype of both strains is due to a genomic mutation. Strain L17 was functionally complemented after transformation with a *H. polymorpha* genomic library. The complementing 2.8 kb DNA fragment did not contain a well-defined ORF and led us to speculate that it may contain regulatory sequences that, when present in multiple copies in the cell, result in a change of expression of specific genes, thus causing restoration of normal methylotrophic growth.

1. INTRODUCTION

T-514 is a plant toxin, isolated from plants of the genus *Karwinskia* (Fig. 1)(DREYER *et al.*, 1975, WAKSMAN *et al.*, 1989). In mammals it causes severe damage to the lung, kidney and liver, where it induces the formation of large intracellular fat deposits and necrosis (BERMUDEZ *et al.*, 1986). Toxicological studies demonstrated a selective toxicity of T-514 on various human tumor cell lines *in vitro* (PIÑEYRO *et al.*, 1994). Preliminary morphological observations suggested that one of the initial effects upon experimental intoxication of rats and monkeys included a significant decrease of the number of peroxisomes present in their hepatocytes (SEPULVEDA, unpublished results). The importance of functional peroxisomes for man is probably best exemplified by the discovery of a group of fatal inherited human diseases (peroxisome deficiency syndromes, e.g. Zellweger syndrome (WANDERS *et al.*, 1988, LAZAROW *et al.*, 1989, BOSCH *et al.*, 1992).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

As a first approach to unravel the mechanism of action of T-514, SEPULVEDA *et al.* (1992) initiated a series of experiments designed to evaluate the effect of this compound on peroxisomes of methylotrophic yeasts. It was shown that administration of sub-lethal concentrations of T-514 to cultures of *Hansenula polymorpha* or *Candida boidinii* caused an irreversible and selective damage of the peroxisomal membrane resulting in malfunctioning of the organelle and leakage of a portion of the major matrix proteins in the cytosol (SEPULVEDA *et al.*, 1992). Based on this specific effect of T-514

on peroxisomes, the drug is now designated peroxisomicine A1.

During the past few years a series of peroxisome-deficient yeast mutants (*pex* mutants; BOSCH *et al.*, 1992) has been isolated from various yeasts. In case of *H. polymorpha* peroxisome-deficiency is invariably associated with the impairment of the cells to grow on methanol as sole source of carbon and energy (methanol-utilization defective: Mut⁻ phenotype) (CREEG *et al.*, 1990, VEENHUIS *et al.*, 1992, TITORENKO *et al.*, 1993). The possibility to isolate yeast cells which are defective in peroxisome function due to treatment of cells with peroxisomicine A1 could be of considerable value in research on toxin/peroxisome interactions and, related to this, probably also on peroxisome function. *H. polymorpha* is a feasible model organism for such studies because of the extensive knowledge on the biochemistry/physiology and ultrastructure of the organism (VEENHUIS *et al.*, 1992), combined with its easy accessibility to classical and advanced molecular genetics (FABER *et al.*, 1994).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

In the present contribution we describe the isolation and initial characterization of two strains of *H. polymorpha*, defective in normal growth on methanol due to the exposure of WT cells to sub-lethal concentrations of peroxisomicine A1. The possible impact of these studies on the use of methylotrophic yeasts as model organisms in toxicology is discussed.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Microorganisms and growth conditions

Wild type (WT) *Hansenula polymorpha* CBS 4732, *H. polymorpha leu1-1* (GLEESON *et al.*, 1979), *H. polymorpha* RV31 (this work) and *H. polymorpha leu1-1* L17 (this work) were grown in batch cultures in mineral media at 37°C (VEENHUIS *et al.*, 1979, VAN DER KLEI *et al.*, 1991). As carbon sources either 0.5 % glucose, 0.5 % glycerol, 0.5 % ethanol or 0.5 % methanol were used and as nitrogen source either 0.25 % ammonium sulphate or 0.25 % methylamine. Leucine was added to a final concentration of 30 mg L⁻¹. Growth was monitored by measuring the optical density of the cultures at 660 nm in a Vitatron colorimeter (A₆₆₀). In addition, the strains were grown in carbon-limited continuous cultures at 37°C in mineral medium (VAN DER KLEI *et al.*, 1991) supplemented with either 0.25 % glucose or 0.25 % glucose/0.3 % methanol at a dilution rate (D) of 0.1 h⁻¹.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

2.2. Peroxisomicine treatment of intact cells

The strains were pregrown to the mid-exponential growth phase (A₆₆₀ = 1.5 - 1.8) in batch cultures supplemented with 0.5 % glucose and subsequently shifted into fresh 0.5 % methanol-containing media at an A₆₆₀ of 0.1. After 2 hours of induction the cells were concentrated (by centrifugation) in fresh methanol-media to an A₆₆₀ of approximately 1.0 and peroxisomicine A1 was administrated at a concentration of 5 µg ml⁻¹. Samples were taken at 1 or 2 h after addition of peroxisomicine A1 and analyzed for cell

viability, the capacity to grow on methanol and their subcellular morphology, using untreated cells as control. Growth was initially tested on 2% Bacto agar plates containing 0.67 % YNB (yeast nitrogen base without amino acids) and 0.5 % glucose (YND) or 0.5 % methanol (YNM). For viability tests peroxisomicine A1 treated cells were spread on YND plates. To identify methanol-utilization-defective (*Mut⁻*) strains, cells were spread on YND plates at a dilution that produced approximately 500 colonies per plate; after 3 days of incubation at 37°C the YND plates were replica-plated onto YNM plates; after another 3 days of incubation at 37°C, colonies which failed to grow on methanol were isolated and further analyzed.

2.3. Preparation of crude extracts and biochemical methods

Crude extracts were prepared as described before (VAN DIJKEN *et al.*, 1976). Alcohol oxidase (AO; EC 1.1.3.13) was assayed as described by VERDUYN *et al.* (1984) and catalase (EC 1.11.1.6) by the method of LÜCK (1963). Protein concentrations were determined according to BRADFORD (1976) using bovine serum albumin as standard. Residual growth substrates in the culture fluid were determined after removal of intact cells by centrifugation in an Eppendorf microfuge, maximal speed, 5 min. Methanol was determined by gas chromatography (LAANBROEK *et al.*, 1982), and glucose by the glucose oxidase-peroxidase method (Boehringer, Mannheim, FRG).

2.4. Cloning and sequence analysis

To enable cloning of the L17 gene by functional complementation, mutant

L17 was transformed by electroporation with a *H. polymorpha* genomic library in vector pHRP2. Transformants were screened for the ability to grow at normal rate on methanol-containing plates. From one positive transformant, a plasmid pHRP2 with an insert of 2.8 kb could be isolated and retransformation to the *L17* mutant showed that indeed this plasmid could functionally complement the *L17* mutant. Double-stranded DNA sequencing of the complementing insert was performed using an ABI 313A automatic sequencer (Applied Biosystems Inc.) using the Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequence Kit.

2.5. *Electron microscopy*

Whole cells were fixed with 1.5 % (w/v) KMnO_4 for 20 min at room temperature. The samples were poststained in 1 % (w/v) uranylacetate, dehydrated in a graded ethanol series and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were cut with a diamond knife and examined in a Philips EM 300.

2.6. *Immunocytochemistry*

For immunocytochemistry, intact cells were fixed in 3 % (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M sodiumcacodylate buffer, pH 7.2, for 30 min at 0°C dehydrated in a graded ethanol series and embedded in Lowicryl K4M. Immunolabelling was performed on ultrathin sections according to the method described by SLOT and GEUZE (1984) using specific antibodies against alcohol oxidase, catalase and dihydroxyacetone synthase. For labeling of the primary antibodies either 10 nm protein A-gold or 15 nm

gold labeled goat-anti-rabbit antibodies were used.

2.7. Miscellaneous

H. polymorpha NCYC 495 (*adell met6*), *H. polymorpha* RV31, a 5-fluorourotic-acid (5-FOA) resistant mutant derived from this strain (*H. polymorpha* RV31 *ura3⁻*) and *H. polymorpha* L17 were used for genetic analysis. Mating, complementation analysis, sporulation and random spore analysis were performed as described previously (CREGG *et al.*, 1990; TITORENKO *et al.*, 1993; GLEESON and SOUDBERY, 1988).

3. RESULTS.

3.1. Peroxisomicine A1 specifically affects peroxisome integrity of *H. polymorpha* cells.

Previous experiments suggested that the peroxisomicine A1 induced damage of peroxisomes in methanol-grown cells may be irreversible (SEPULVEDA *et al.*, 1992). For this reason we now studied the effect of the toxin in *H. polymorpha* WT cells which are known to contain generally only a single peroxisome, namely in cells pregrown in batch cultures to the mid-exponential growth phase on glucose and subsequently incubated in methanol-containing media for two hours (VEENHUIS *et al.*, 1979). We anticipated that damage of this single organelle might have severe consequences for the capacity of the cells to grow on methanol since the metabolism of this compound is strictly dependent on the presence of

intact organelles (VAN DER KLEI *et al.*, 1991). However, the growth experiments revealed that the viability of these freshly methanol-induced cells after peroxisomicine A1 treatment was similar as observed before in that concentrations $>10 \mu\text{g ml}^{-1}$ were lethal whereas lower concentrations were sub-lethal in a dose/response related manner (for details see SEPULVEDA *et al.*, 1992).

Electron microscopical data revealed that treatment of cells, incubated in methanol for 2 h, with $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ peroxisomicine A1 for 1-2 h specifically affected peroxisomes. As expected, the cells contained generally a single organelle, which frequently displayed ruptures of its surrounding membrane; other subcellular membranes, e.g. the cell membrane and surrounding membranes of nuclei, mitochondria or vacuoles were virtually unaffected (Fig. 2A). Similar results were obtained with the *H. polymorpha leu 1-1* auxotrophic strain (data not shown). We conclude from this that peroxisomicine A1, when administrated at sub-lethal doses, does affect the integrity of the peroxisomes in *H. polymorpha* but not their development.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.2. Isolation and biochemical characterization of methanol- utilization-defective (Mut⁻) strains from peroxisomicine A1 treated cells.

To further investigate the reversibility of the peroxisomicine A1-induced damage of peroxisomes, cells were incubated in the presence of $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ peroxisomicine A1 for 1-2 hours and subsequently analyzed for growth on glucose and methanol by means of the replica-plating technique described

in Material and Methods. These experiments resulted in the isolation of strains which were impaired to grow on methanol on solid agar plates, although at very low frequencies. Morphological analyses of cells, induced for 24 h on methanol, of the various strains obtained revealed that the cells were invariably affected in peroxisome size and/or number, ranging from cells containing large organelles of abnormal shape (*pss* phenotype; (TITORENKO *et al.*, 1992) to cells with few relatively small organelles (Fig. 2D).

Two strains, designated RV31 and L17(*leu1-1*), were selected for further analysis on the basis of their growth properties and peroxisome morphology. YND-grown colonies of both strains, replicated on YNM plates, failed to grow in a period of 5 days, after which growth started albeit very slow as compared to WT controls (Fig. 3). Subsequent studies in liquid cultures showed that the strains were able to grow on various carbon and nitrogen sources tested, including those that require peroxisome-borne enzyme activities for growth (Table 1; not shown for strain L17). However, the final optical density of the cultures always remained below the values observed for WT controls. Of all compounds tested, growth on methanol was most severely affected (Fig. 4). As is evident from this Figure, the rate of methanol utilization by RV31 cells is reduced compared to WT controls, although methanol is fully used up in both cultures. This is in agreement with the finding that AO activity is normally induced, although at a reduced levels compared to WT cells; in contrast, catalase activities were not affected (Table 2). However, comparison of the amounts of methanol used and the optical density of the culture. e.g. at a residual concentration

of approximately 0.25 % methanol (Fig. 4; A_{660} RV31 = ± 2 , A_{660} WT = ± 3), clearly show that the conversion of the carbon source into biomass is much less efficient in the RV31 strain.

A reduced yield was also evident in glucose-limited chemostat cultures of both strains, to which methanol was added as a second growth substrate. The data obtained showed that the final yield of cultures of L17, measured as A_{660} at steady state conditions, was slightly reduced compared to WT controls (L17 A_{660} = 6.6, WT A_{660} = 7.0). In both the L17 and the WT cultures no residual glucose or methanol could be detected in the culture medium when the cultures had reached steady state conditions. Similar results were obtained with strain RV31. Also in chemostat-grown cells the specific AO activity remained significantly below the values normally found in WT cultures (AO activity L17 = 2.2 Units (mg. protein)⁻¹, WT = 8.0; VAN DER KLEI *et al.* 1991).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

3.3. Ultrastructural analysis.

The morphological adaptations of L17 and RV31 cells, following a shift of cells from glucose to methanol-containing media, was examined by electron microscopy. The data, summarized in Fig. 5 show that in the initial 4 hours after the shift peroxisomes developed (Fig. 5A). Typically, the organelles showed ruptured peroxisomal membranes in ultrathin sections of $KMnO_4$ -fixed cells, while other organelles showed no obvious morphological deviations. Before this time no visible differences had occurred in the cells.

As described previously, within the first 2 h after the change over the methanol, one small peroxisome per cell, surrounded by a single continuous membrane were found (VEENHUIS *et al.*, 1979). Immunocytochemical experiments on sections of these cells, using α -AO, α -CAT or α -DHAS, revealed that bulk of the labeling was concentrated on peroxisomal profiles; however, also a low but specific labeling was observed in the cytosol (Fig. 5C,D; not shown for DHAS). After approximately 8 h of incubation the initially formed organelles had reached their mature size and multiplied by fission. At this stage of cultivation also the first degrading peroxisomes were observed. Our data strongly suggested that in particular the larger, mature organelles were subject to degradation resulting in cells which generally contained only few, relatively small peroxisomes in conjunction with one or few organelles in various stages of degradation (Fig. 5B). After entering the stationary growth phase (> 24 h of incubation) the cells of the culture gradually degenerated and subsequently died. Also in chemostat cultures of L17 and RV31 on glucose/methanol mixtures a high turnover rate of individual peroxisomes was observed (not shown). As a consequence, such cells contained a relatively low volume density of peroxisomes. This low volume density was in good agreement with the observed specific AO activities (see above).

3.4. Genetic analysis

In order to study whether the L17 and RV31 strains were in fact mutants affected in the same gene, genetic analysis was performed. Since mating of RV31 and L17*leu1-1* with the auxotrophic *H. polymorpha adell met6* strain failed, we generated a 5-fluoro-orotic-acid (5-FOA) resistant mutant

from RV31 (BOEKE *et al.*, 1984). The resulting *H. polymorpha* RV31 *ura3⁻* strain was crossed with L17. In order to establish whether the eventual mutations in RV31 *ura3⁻* and L17 *leu1-1* causing the *mut⁻* phenotype were recessive or dominant, both mutants were crossed with their corresponding mutual isogenic strains carrying complementary markers, namely *ura3⁻* and *leu1-1*, respectively. After crossings, all diploids normally grew on methanol at WT rates. Random spore analysis revealed that strains L17 and RV31 behave as recessive mutants which cannot complement each other.

The *H. polymorpha* L17 *leu1-1* strain was used for transformation with a *H. polymorpha* genomic library (GLEESON *et al.*, 1988). Transformation was carried out by the routine procedure, described before (FABER, *et al.*, 1994). Transformants were selected on YND plates, lacking leucine. After 3-4 days the transformants were replica-plated onto YNM-plates and selected for the restoration of growth on methanol as a sole source of carbon and energy at WT rates. One positive transformant was selected; plasmid DNA was isolated from this strain and amplified in *E. coli*. Restriction analysis of purified plasmid DNA from *E. coli* revealed a 2.8 kb *H. polymorpha* genomic fragment which, after retransformation in *H. polymorpha* L17, complemented the original growth defect of the strain on methanol. Electron microscopical analysis of the transformed *H. polymorpha* L17 strain revealed that the cells contained normal peroxisomes and did not display the typical peroxisome membrane ruptures and organelle turnover events of the L17 host strain during methylotrophic growth. The

complementing fragment was isolated as a *NheI-SphI* fragment and cloned into the *SmaI* site of pBluescript II SK⁺ using blunt-end cloning. Sequencing of the 2.8 kb fragment revealed no apparent open reading frames (ORFs); also, the sequence obtained did not show any significant homologies with known sequences in the databases.

4. Discussion.

We have isolated two strains of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* affected in the normal use of methanol as sole source of carbon and energy, which were obtained after treatment of whole cells with the plant toxin peroxisomicine A1. As shown before (SEPULVEDA *et al.*, 1992), Peroxisomicine A1 affects the integrity of the peroxisomal membrane when administrated at sub-lethal doses to methanol-grown cells of *H. polymorpha*. Our present result suggests that damage of the peroxisomal membrane of *H. polymorpha* by peroxisomicine A1 is a highly reproducible event and furthermore confirmed the suggestion that peroxisomes may indeed represent the initial target organelle of the toxin-514, which is therefore now designated peroxisomicine A1. Likely, the first target of the toxin is one (or more) specific peroxin(s), essential for peroxisome integrity. Possible target molecules are HpPex3p (BAERENDS *et al.*, 1996), an integral membrane protein essential for the membrane biosynthesis and integrity, or HpPex6p, a AAA ATPase essential for peroxisome biogenesis and associated with the peroxisomal membrane (KIEL *et al.*, submitted).

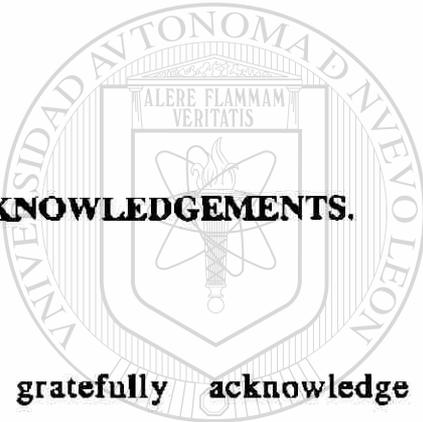
The two strains isolated (RV31 and L17) are clearly affected in peroxisome function. This was convincingly demonstrated by the findings that i) the enzymes essential for methanol catabolism were present and ii) the biomass in batch cultures of both strains was significantly decreased compared to WT controls while methanol was fully consumed by the cells. However, methanol can normally be used as additional energy source in glucose-limited cultures and then results in an increase in biomass which is largely comparable to identically grown WT cultures, indicating that the cytosolic dissimilation pathway is apparently efficiently operative. Our data therefore led us to conclude that growth of strains RV31 and L17 in batch cultures on methanol as the sole carbon and energy source suffers from specific energetic disadvantages in particular in the catabolism of methanol. We speculate that these disadvantages are related to peroxisome dysfunction rather than to other defaults in methanol intermediary metabolism and are most likely related to hydrogen peroxide metabolism. As shown before (VAN DER KLEI *et al.*, 1991), decomposition of hydrogen peroxide in methanol-grown *H. polymorpha* other than by peroxisomal catalase is energetically disadvantageous and leads to reductions in biomass. In L17 and RV31 cells hydrogen peroxide leakage from damaged organelles can easily be envisaged thus explaining the negative growth effects.

At present we can only speculate on the nature of the mechanism which accounts for the functional complementation of strain L17 with the isolated

2.8 kb genomic fragment. Clearly, this fragment does not contain a well-defined open reading frame (ORF) and as a consequence it does not contain a complete gene encoding for a specific protein. A likely explanation for its complementing effect is that the DNA fragment contains regulatory sequences which either interfere with a specific suppressor gene or, less likely, that it encodes for only part of the mutated protein and complements by a recombination event. If the fragment acts as a promoter it may bind to transcription factors resulting in a change in the expression of certain genes and thus in faster growth on methanol.

It is also not beyond doubt whether peroxisomicine A1 can act as a mutagenic agent. After peroxisomicine-treatment of WT cells only few constitutive Mut colonies were picked up and these low frequencies could readily be interpreted as representing spontaneous mutations. However, the genomes of the *H. polymorpha* strains used are very stable and spontaneous mutations are extremely scarce under normal laboratory conditions. Moreover, at least one example is known in which a comparable drug (the cytostaticum adriamycin (KEYANI and KEYANI, 1980) has a strong effect on peroxisome proliferation in yeast apparently due to a mutation of the proliferation machinery. Therefore, a mutagenic effect on the yeast by the toxin might be possible. In both strains isolated, it resulted in an irreversible slow growth on methanol after removal of the toxin. A possible explanation for this is that the mutation caused overexpression (or suppression) of a specific gene which resulted in restoration of normal growth of the strain on methanol. The yeast multidrug resistant phenotype due to overexpression of certain genes has been firmly documented (BALZI

and GOFFEAU, 1995); the *Saccharomyces cerevisiae* *PDR1*, *PDR3*, *PDR7* and *PDR9* genes encode transcription regulators that control the expression of the gene *PDR5* which encodes a membrane protein of the ATP-binding-cassette protein family, functioning as a drug extrusion pump (SWARTZMAN *et al.*, 1996). The possibility to use *H. polymorpha* as a model organism for toxicology, related to peroxisome function, is currently explored.



ACKNOWLEDGEMENTS.

We gratefully acknowledge the assistance of Melchior Evers, Robert Hilbrands and Vladimir Titorenko in different parts of this study. We thank Jan Zagers and Victor Hugo Juarez for skilful technical assistance and to Marco Flores for his help on computer use.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

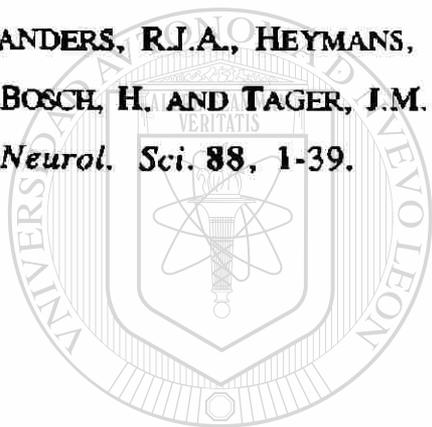
REFERENCES.

- BAERENDS, R.J.S., RASMUSSEN, S.W., HILBRANDS, R.E., VAN DER HEIDE, M., FABER, K.N., REUVEKAMP, P.T.W., KIEL, J.P.K.W., CREGG, J.M., VAN DER KLEI, I.J. AND VEENHUIS, M. (1996) The *Hansenula polymorpha* PER9 gene encodes a peroxisomal membrane protein essential for peroxisome assembly and integrity. *J. Biol. Chem.* **271**, 8887-8894.
- BALZI, E., AND GOFFEAU, A. (1995) Yeast multidrug resistance: the PDR network. *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**(1), 71-76.
- BERMUDEZ, M.V., GONZALEZ SPENCER, D., GUERRERO, M., WAKSMAN, N., PIÑEYRO, A. (1986) Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). *Toxicon* **24**, 1091-1097.
- BOEKE, J.M., LACROUTE, F. AND FINK, G.R. (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* **197**, 345-346.
- BOSCH, H. VANDEN, SCHUTGENS, R.B.H., WANDERS, R.J.A. AND TAGER, J.M. (1992) Biochemistry of peroxisomes. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 157-197.
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- CREGG, J.M., VAN DER KLEI, I.J., SULTER, G.J., VEENHUIS, M. AND HARDER, W. (1990) Peroxisome deficient mutants of *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **6**, 87-97.
- DUKEN, J.P. VAN, OTTO, R. AND HARDER, W. (1976) Growth of *Hansenula polymorpha* in a methanol-limited chemostat. Physiological responses due to the involvement of methanol oxidase as a key enzyme in

- methanol metabolism. *Arch. Microbiol.* **111**, 137-144.
- DISTEL, B., ERDMAN, R., GOULD, S.J., BLOBEL, G., CRANE, D.I., CREGG, J.M., DAT, G., FUJIKI, Y., GOAMAN, J.M., JUST, W.W., KIEL, J.A.K.W., KUNAU, W., LAZAROW, P.B., MANNAERTS, G.P., MOSER, H.W., OSUMI, T., RACHUBINSKY, R.A., ROSCHER, A., SUBRAMANI, S., TABAK, H.F., TSUKAMOTO, T., VALLE, D., VAN DER KLEI, I., VAN VELDHoven, P.P., AND VEENHUIS, M. (1996) A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *J. Cell. Biol.* **135**, 1-3.
- DREYER, D., ARAI, I., BACHMAN, C., ANDERSON, W.R., SMITH, R., DAVES, G.D. (1975) Toxins causing noninflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 4985-4990.
- FABER, K.N., HAIMA, P., HARDER, W., VEENHUIS, M. AND AB, G. (1994) Highly efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr. Genet.* **25**, 305-310.
- GLEESON, M.A. AND SUDBERY, P.E. (1988) Genetic analysis in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **4**, 293-303.
- KEYHANI AND KEYHANI (1980) Peroxisome proliferation in adriamycin treated yeast during the recovery phase. In: *Electron Microscopy*, pp. 86-87. (Brederoo, P. and de Priester, W., Eds), Volume 2, NUEVO LEÓN
- KLEI, I.J. VAN DER, HARDER, W. AND VEENHUIS, M. (1991) Methanol metabolism in a peroxisome-deficient mutant of *Hansenula polymorpha*: a physiological study. *Arch. Microbiol.* **156**, 15-24.
- LAANBROEK, H.J., ABEE, T. AND VOOGD, J.L. (1982) Alcohol conversions by *Desulfobulbus propionicus* Lindhorst in the presence and absence of sulfate and hydrogen. *Arch. Microbiol.* **133**, 178-184.
- LAZAROW, P.B. AND MOSER, H.W. (1989) Disorders of peroxisome biogenesis. In: *The metabolic basis of inherited diseases*, pp. 1479-1509 (Scriver C.R., Beaudat, A.L., Sly, W.S. and Valle, D., Eds.). New York: McGraw-Hill.

- LÜCK, H. (1963). Catalase. In: *Methods of enzymatic analysis*, pp. 885-894 (Bergmeijer, H.U., Ed.). London/New York: Acad. Press.
- PIÑEYRO-LÓPEZ, A., MARTINEZ DE VILLARREAL, L., GONZÁLEZ-ALANIZ, R. (1994) *In vitro* selective toxicity of toxin T-514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines. *Toxicology* **92**, 217-224.
- SEPULVEDA SAAVEDRA, J., VAN DER KLEI, I.J., KEIZER, I., LÓPEZ, A.P., HARDER, W. AND VEENHUIS, M. (1992) Studies on the effect of toxin T-514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *FEMS. Microbiol. Lett.* **91**, 207-212.
- SLOT, J.W. AND GEUZE, H.J. (1984) Gold markers for single and double immunolabeling of ultrathin cryosections. In: *Immunolabeling for electron microscopy*, pp. 129-142 (Polak, J.M. and Varndell, J.M., Eds.). Amsterdam: Elsevier Sci. Publ.
- SWARTZMAN, E.E., VISWANATHAN, N., AND THORNER, J. (1996) The PAL1 gene product is a peroxisomal ATP-binding cassette transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* **134**(4), 549-563
- TITORENKO, V.I., WATERHAM, H.R., CREGG, J.M., HARDER, W. AND VEENHUIS, M. (1993) A complex set of interacting genes controls peroxisome biogenesis in *Hansenula polymorpha*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7470-7474.
- TITORENKO, V.I., WATERHAM, H.R., HAIMA, P., HARDER, W. AND VEENHUIS, M. (1992) Peroxisome biogenesis in *Hansenula polymorpha*: different mutations in genes, essential for peroxisome biogenesis, cause different peroxisomal mutant phenotypes. *FEMS. Microbiol. Lett.* **95**, 143-148.
- VEENHUIS, M., KEIZER, I. AND HARDER, W. (1979) Characterization of peroxisomes in glucose-grown *Hansenula polymorpha* and their

- development after the transfer of cells into methanol-containing media, *Arch. Microbiol.* **120**, 167-175.
- VEENHUIS, M. (1992). Peroxisome biogenesis and function in *Hansenula polymorpha*. *Cell Biochem. and Function.* **109**, 175-184.
- VERDUYN, C., VAN DIJKEN, J.P. AND SCHEFFERS, W.A. (1984) Colorimetric alcohol assays with alcohol oxidase. *J. Microbiol. Methods* **2**, 15-25.
- WAKSMAN, N., AND RAMIREZ, R.D. (1992) Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*. *Rev. Latinoamer. Quím.* **23/1** and **22/4**, 25-27.
- WANDERS, R.J.A., HEYMANS, H.S.A., SCHUTGENS, R.B.H., BARTH, P.G., VAN DEN BOSCH, H. AND TAGER, J.M. (1988) Peroxisomal disorders in neurology. *J. Neurol. Sci.* **88**, 1-39.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Table 1. Optical densities of *H. polymorpha* wild type (WT) cells and RV31 cells, grown in batch cultures supplemented with various carbon and nitrogen sources.

Strain	Growth conditions	Optical density (A_{660})
WT	glucose/ammonium sulphate	5.5±0.1
RV31	glucose/ammonium sulphate	5.2±0.2*
WT	ethanol/ammonium sulphate	5.0±0.2
RV31	ethanol/ammonium sulphate	3.4±0.03*
WT	glycerol/ammonium sulphate	8.6±0.1
RV31	glycerol/ammonium sulphate	6.2±0.02*
WT	glucose/methylamine	4.3±0.1
RV31	glucose/methylamine	3.4±0.02*

Data are presented as final optical density of cultures in the stationary growth phase. Each value is shown as mean of three determinations ± S.E.

*Significant difference from WT by Student's t-test ($p < 0.05$).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Table 2. Activities of alcohol oxidase and catalase in *Hansenula polymorpha* RV31 cells after a shift of cells from glucose into methanol-containing media.

Time (h)	alcohol oxidase [§]		catalase	
	RV31 cells	WT cells	RV31 cells	WT cells
0	0	0	2.9±0.8 [†]	3.1±0.2
4	0.7±0.2	0.7±0.3	93±2.1	98±1.8
8	1.2±0.1	2.5±0.3	144±1.5	148±1.8
12	2.3±0.5	4.2±1.2	177±1.6	173±2.0
24	2.5±0.2	4.7±1.5	196±2.5	190±3.1

[§]Alcohol oxidase is expressed as Units. mg protein⁻¹, catalase as $\Delta E_{240} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$.

[†]Each value is shown as mean of three determinations \pm S.E.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LEGENDS FOR FIGURES.

Electron micrographs are taken of KMnO_4 -fixed cells unless otherwise stated. Abbreviations: N, nucleus; M, mitochondrion; P, peroxisome; V, vacuole. The bar represents $0.5 \mu\text{m}$.

Fig. 1. Structure of toxin 514 (peroxisomicine A1).

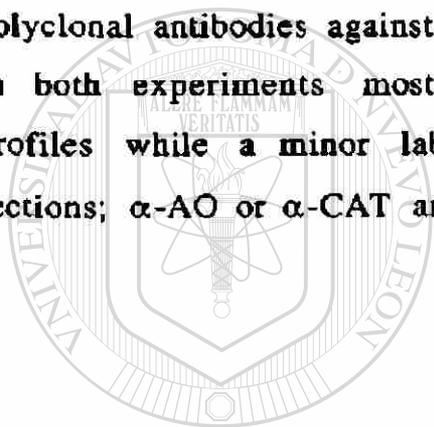
Fig. 2. Ultrathin section of KMnO_4 -fixed cells of *H. polymorpha*, grown in batch culture on 0.5 % methanol for 4 h (Fig. 2A) and 12 h (Fig. 2B). After subsequent incubation with $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ peroxisomicine A1, the typical damage of the peroxisomal membrane is observed (Fig. 2C; arrow). Fig. 2D shows the relatively large peroxisomes of irregular shape observed in other incubated strains after peroxisomicine A1 treatment.

Fig. 3. Replica-plating technique showing methanol-utilization defective colonies isolated after treatment of *Hansenula polymorpha* WT cells with peroxisomicine A1. The plates were incubated for 5 days at 37°C . Upper panel: WT controls A: glucose, B: methanol; lower panel RV31 cells (C: glucose, D: methanol).

Fig. 4. Growth (\blacktriangle) and methanol utilization (Δ) of *H. polymorpha* wild type and RV31 cells (\circ growth; \bullet methanol concentration) after a shift of cells from glucose into fresh cultures, supplemented with 0.5 % methanol. Growth is expressed as optical density at 660 nm (A_{660}), methanol

concentrations as percentages in the culture medium. Each value is the mean of three determinations.

Fig. 5. Ultrathin section of strain RV31, grown in batch culture on 0.5 % methanol for 4 h, showing development of a peroxisome with a ruptured peroxisomal membrane (Fig. 5A; arrow). Compare also Fig. 2A/C for details. Fig. 5B shows the initial stage of peroxisome degradation, namely uptake of the organelle (*) in the vacuole. Fig. 5C,D: immunocytochemical experiments on ultrathin sections of methanol-induced RV31 cells, labeled with specific polyclonal antibodies against alcohol oxidase (Fig. 5C) and catalase (Fig. 5D). In both experiments most of the labeling is observed on peroxisomal profiles while a minor labeling is evident on the cytoplasm (Lowicryl sections; α -AO or α -CAT and goat- α -rabbit/gold, uranyl acetate).

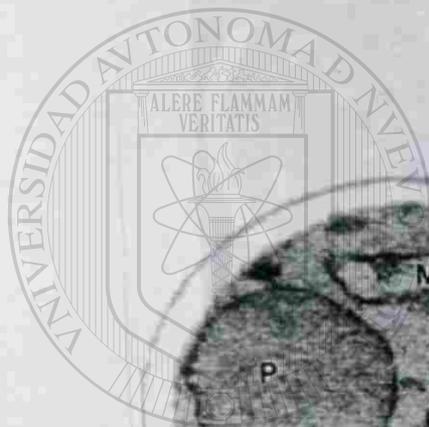


UANL

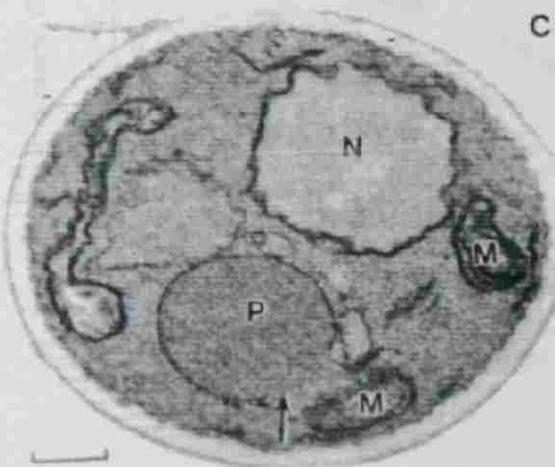
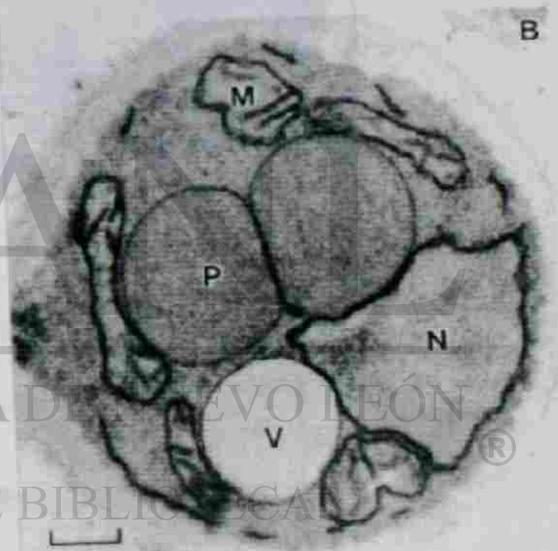
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

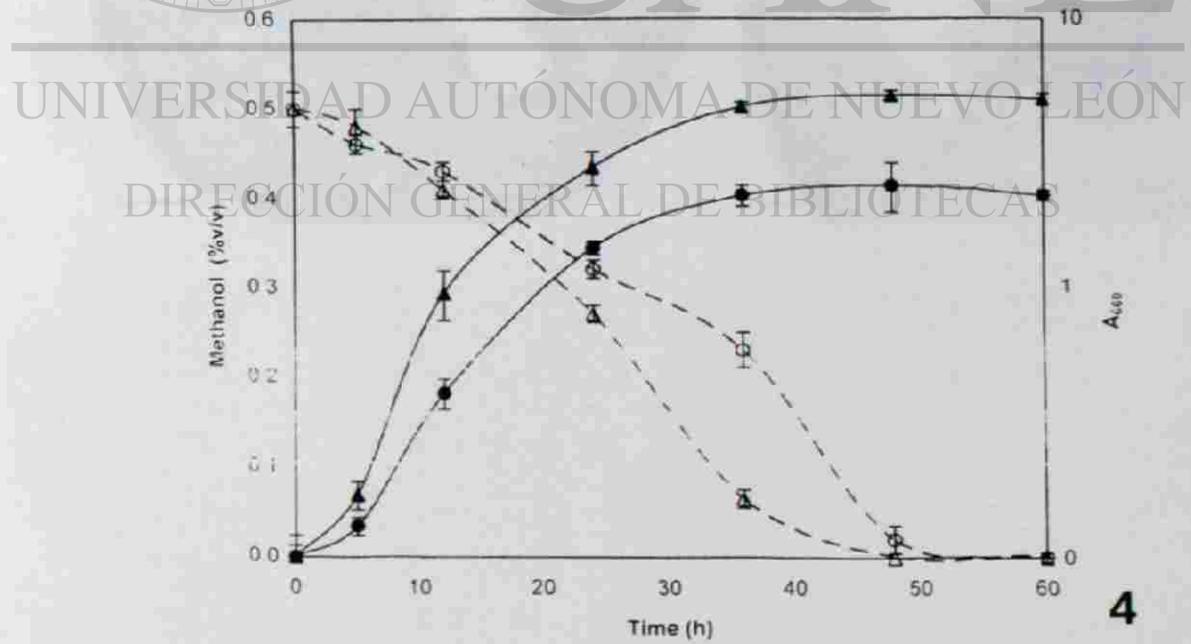
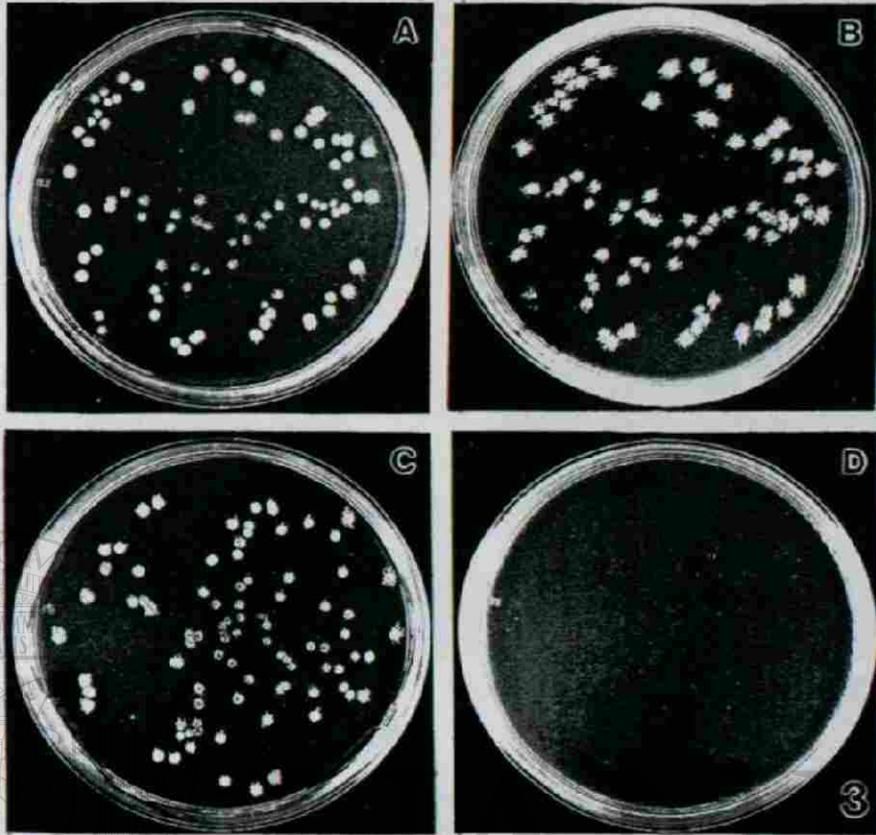
®

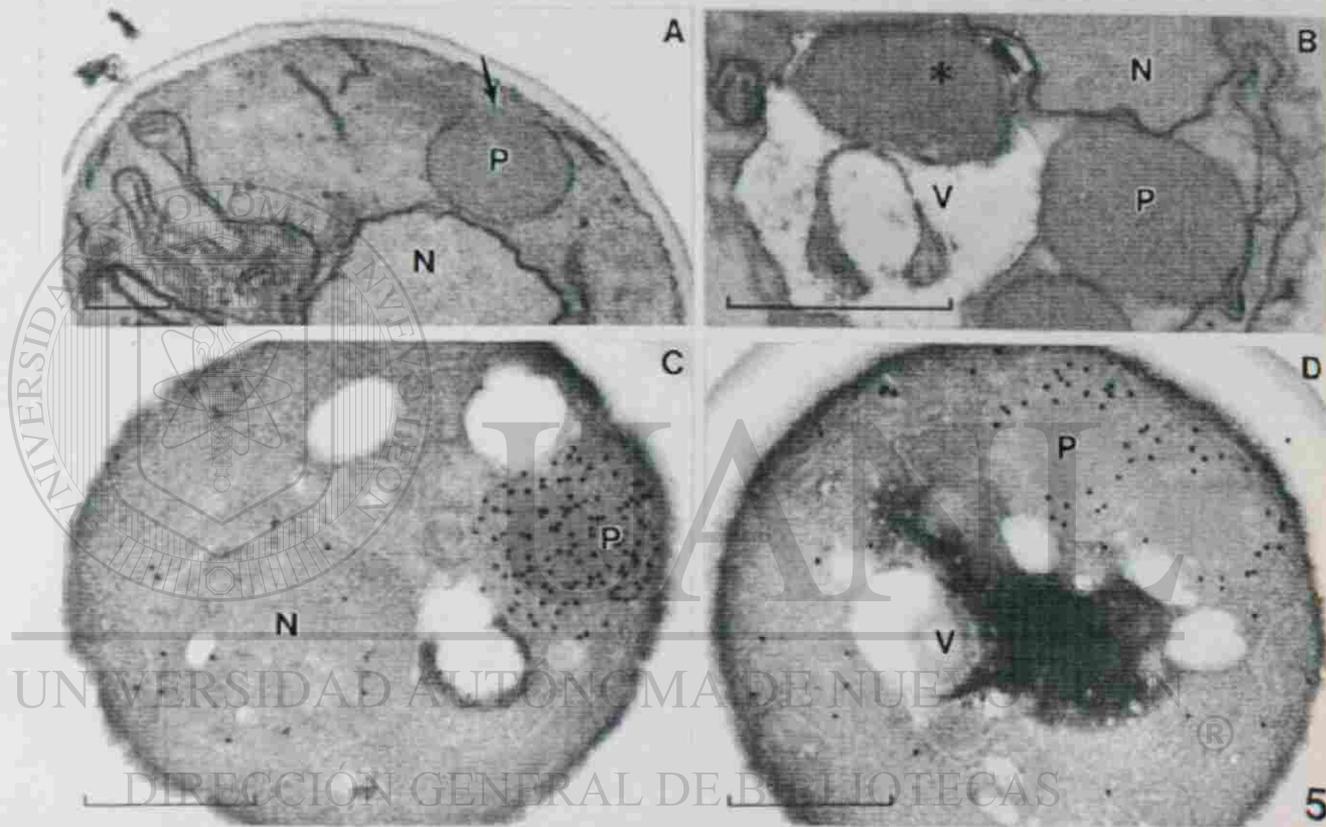
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECA







UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

