

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Efecto del estrés salino en la regulación transcripcional de los genes *DhGDH1* y *DhGLN1*, cuyos productos participan en la asimilación de amonio en la levadura halotolerante  
*Debaryomyces hansenii*

**T E S I S**

que para obtener el grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

presenta

**M. EN C. CARLOS ALBERTO GUERRERO HERNÁNDEZ**

Directora de Tesis:

**Dra. Alicia González Manjarrez**

m346198



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALI  
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Guerrero Hernández  
Carlos Alberto

FECHA: 25 Junio - 2005

FIRMA: 

Este trabajo se llevó acabo en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Alicia González Manjarrez.

Durante el desarrollo de esta tesis fui apoyado economicamente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con la beca número 119373. También se recibió un apoyo del programa de becas de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.



***A Aleida***

## **Agradecimientos**

Quiero empezar por dar gracias a la vida que me ha tocado vivir, sin ella no estaría en estos momentos aquí.

Aleida, gracias por ser mi compañera de viaje a cada uno de los lugares visitados, pero sobre todos te agradezco ser mi compañera del viaje más importante, mi vida. Le doy gracias a Dios por haberte conocido, nunca olvidare nuestro primer viaje a Oaxaca, pero sobretodo las pláticas y enseñanzas de cada día que he tenido contigo. Te Amo Con Todo Mi Corazón.

A mis padres, Alejandrina y Rosendo, les debo lo que soy. A mi madre le dedico cada uno de mis logros profesionales y personales, mil gracias por ser una MAMÁ muy especial.

A mis Grandes hermanos, Norma, Elizabeth, Alejandro y Rosendo y a mis sobrinos Mariana y Adrián. Gracias por tenerme paciencia y escucharme, por las risas juntos, los enojos, las travesuras.....

Norma, nunca acabare de agradecer a la vida, lo feliz que me hace tener una hermana como tú, siempre apoyándome y echándome porras para seguir adelante, gracias por los quesos que han llenado nuestra vida.

A la familia nueva que tengo ahora, a la señora Edith, gracias por sus pláticas y por sus buenos deseos, es una excelente Persona; a su hijo Yostal y su esposa Edith y esos grandiosos nietos Yostal y Diego; a Edith y a su esposo Eric, por las risas que nos ocasiona su pequeño Emilio; a Román y a Rosa que a pesar de estar lejos siempre preguntan como estamos. A el señor Yostal gracias por su apoyo y sus pláticas.

A cada uno de mis maestros, Rosita, Lupina, Guadalupe, Juanita, Iginia, Química Hinojosa, Mercedes, Imelda, MVZ Tagle, Químico Castréjon, Dra. Doris, Dr. Beto Pancho, Química M. Oliva, Químico Trejo, Químico Eduardo a todos y a cada uno gracias por apoyarme.

A mis amigos, Elizabeth, David, Alma, Diana, Josefa (Dulce), Alicia, Mari Coco, Vero, Ani, Hugo, y en especial a Rocío, Maru, Clara, Flor y Canchola, por las pláticas y los buenos recuerdos, y a los que he olvidado, Gracias.

A mis compañeros de laboratorio Alexander, Amaranta, Lina, Claudia, Héctor, Memo, Lalo, Nelly, Pilar y a Víctor, por las pláticas y las risas en el 301-Oriente. Cristina Aranda eres el alma y el corazón del laboratorio, siempre estarás en mi pensamiento. Las visitas de Miriam Vázquez que me dieron la oportunidad de conocerla y saber que es una gran persona.

Un reconocimiento a la Dra. Rosaura Hernández, por su confianza, su amistad, su respeto, su entrega y su mirada critica, Gracias.

Quiero agradecerle a Alicia por la confianza y por aceptarme en su laboratorio, su interés en el proyecto, gracias por tus enseñanzas.

A la ayuda del Dr. Roberto Coria y de la Dra. Laura Ongay y a la Maestra M. Mora.

A mi jurado de examen que revisó críticamente este documento, conformado por la Dra. Rosaura Hernández Rivas, Dra. Guadalupe Espín Ocampo, Dr. Antonio Peña Díaz, Dra. Alicia González Manjarrez, Dra. Patricia Thóme Ortiz, Dra. Gloria Soberón Chávez, Dr. Jorge Luis Folch Mallol.

A mi comité tutorial que estuvo conformado por los doctores Luis Servín González, Guadalupe Espín Ocampo y Alicia González Manjarrez. Gracias por sus comentarios y ayuda.

Solo me resta agradecer a mis tíos y a mis abuelos, quiero dedicarle con mucho cariño este trabajo a cada una de las personas que me han apoyado de cualquier manera y hacer un reconocimiento muy especial a mi esposa que siempre me escucha.

A todas las personas que he olvidado un reconocimiento muy especial.

Gracias nuevamente.....

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
RESUMEN EN INGLÉS.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
1. Estrés osmótico en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
1.1. La respuesta a estrés osmótico en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
1.2. Regulación del estado de activación de la proteína Hog1	
2. Metabolismo afectado por estrés osmótico	
2.1. Metabolismo de Nitrógeno en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
2. 1.1. Factores de transcripción GATA involucrados en la represión catabólica nitrogenada (NCR)	
3. <i>Debaryomyces hansenii</i> un modelo de osmotolerancia	
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	37
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
1. Aislamiento y análisis de funcionalidad del gen <i>DhGDH1</i> de <i>D. hansenii</i> en la cepa <i>S. cerevisiae gdh1Δ gdh3Δ GLT1</i> transformada con el plásmido pDhGDH1-1.	



2. Efecto de los reguladores transcripcionales Gln3p y HAP2-3p sobre la expresión del gen *DhGDH1* en la cepa *S. cerevisiae* transformada con el plásmido pDhGDH1-1.
3. Análisis la expresión del gen *DhGDH1* en la cepa silvestre, *D. hansenii* y en la cepa *S. cerevisiae* transformada con el plásmido pDhGDH1-1, al crecerlas en medios de cultivo con diferente concentración de NaCl.
4. Aislamiento del gen *DhGLN1* de *D. hansenii*.
5. Análisis de la expresión del gen *DhGLN1*, en *D. hansenii* y en la en la cepa complementada de *S. cerevisiae*  $\Delta gln1$  usando diferentes concentraciones de NaCl.
6. Efecto de la sal sobre la expresión de los genes *GDH1* y *GLN1* de la cepa silvestre de *S. cerevisiae*, cultivada con diferentes concentraciones de NaCl.
7. Localización cromosómica de los genes *DhGDH1* y *DhGLN1*

<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>72</b>
<b>VI. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>74</b>
<b>VII. REFERENCIAS.....</b>	<b>75</b>
<b>VIII. APÉNDICE I.....</b>	<b>84</b>
<b>IX. RESULTADOS PUBLICADOS.....</b>	<b>86</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS y TABLAS

### I. INTRODUCCIÓN

- Figura 1.** Vías de de activación de la MAPK HOG 10
- Figura 2.** Modelo de activación transcripcional medida por la cinasa Hog1 16
- Figura 3.** Metabolismo central de nitrógeno en *S. cerevisiae* 19

### IV. RESULTADOS

- Figura 4.** Obtención del gen *DhGDH1* de *D. hansenii* 41
- Figura 5.** Curvas de crecimiento de la cepa CLA14 transformada con el vector pDhGDH1-1 44
- Tabla 1.** Determinación de actividad enzimática de NADP-glutamato deshidrogenasa de la cepa transformada con el gen *DhGDH1* 46
- Figura 6.** Inmunoblot de la proteína NADP-GDH 49
- Figura 7.** Inicio de transcripción de *DhGDH1* 51
- Figura 8.** Secuencia y elementos en *cis* del promotor *DhGDH1* 55
- Figura 9.** Expresión del gen *DhGDH1*, en mutantes afectadas en factores transcripcionales del metabolismo del carbono y del nitrógeno 56
- Figura 10.** Curvas de crecimiento de *D. hansenii* y *S. cerevisiae*, cultivadas en medio mínimo con concentraciones crecientes de NaCl. 58

<b>Figura 11.</b> Expresión del gen <i>DhGDH1</i> en <i>D. hansenii</i> utilizando concentraciones crecientes de NaCl	<b>60</b>
<b>Figura 12.</b> Expresión del gen <i>DhGDH1</i> en la cepa de <i>S. cerevisiae</i> Transformada con el vector pDhGDH1-1 utilizando concentraciones crecientes de NaCl	<b>61</b>
<b>Figura 13.</b> Expresión del gen <i>DhGLN1</i> en <i>D. hansenii</i> utilizando concentraciones crecientes de NaCl	<b>65</b>
<b>Figura 14.</b> Expresión del gen <i>DhGLN1</i> en la cepa de <i>S. cerevisiae</i> transformada con el vector pDhGLN1-1 utilizando concentraciones crecientes de NaCl	<b>66</b>
<b>Figura 15.</b> Expresión del gen <i>GDH1</i> y <i>GLN1</i> en <i>S. cerevisiae</i> utilizando concentraciones crecientes de NaCl	<b>69</b>
<b>Figura 16.</b> Electroforesis de cromosomas en campos pulsados	<b>71</b>

## ÍNDICE DE TRABAJO PUBLICADO

### IX. RESULTADOS PUBLICADOS

<b>ARTÍCULO</b>	<b>Salt-dependent expression of ammonium assimilation genes in the halotolerant yeast, <i>Debaryomyces hansenii</i></b> <i>Curr Genet</i> (2005) 47: 163–171	<b>86</b>
-----------------	---	-----------

## i. RESUMEN

*Debaryomyces hansenii* está adaptada para crecer en ambientes salinos, en los que acumula altas concentraciones de sodio. La actividad de la NADP-glutamato deshidrogenasa codificada por el gen *DhGDH1* aumenta en un ambiente salino. Así, se ha propuesto que para superar la inhibición de la actividad enzimática por el sodio, este organismo posee mecanismos dependientes de sal que resultan en un aumento en la actividad enzimática de las vías metabólicas centrales. Sin embargo, no se han analizado los mecanismos involucrados en el aumento de la actividad enzimática. Para resolver esta cuestión, estudiamos la expresión de los genes *DhGDH1* y *DhGLN1* que codifican para la NADP-glutamato deshidrogenasa y glutamino sintetasa, respectivamente, las cuales constituyen el circuito metabólico central involucrado en la asimilación de amonio. Se encontró que i) la expresión de *DhGDH1* aumentó cuando *D. hansenii* fue crecida en presencia de altas concentraciones de cloruro de sodio, mientras que la *DhGLN1* se redujo; ii) la expresión de *DhGDH1* en *S. cerevisiae* tiene lugar de una forma dependiente de *GLN3* y *HAP2, 3*, y iii) la expresión dependiente de sal de *DhGDH1* y *DhGLN1* involucra mecanismos limitados a *D. hansenii* y ausentes en *S. cerevisiae*. Así, la regulación dependiente de sal de genes involucrados en vías metabólicas centrales podría formar parte de una estrategia que conduce a la capacidad para crecer bajo condiciones hipersalinas.



## ii. ABSTRACT

*Debaryomyces hansenii* is adapted to grow in saline environments, accumulating high intracellular  $\text{Na}^+$  concentrations. Determination of the *DhGDH1* encoded NADP-glutamate dehydrogenase enzymatic activity showed that it was increased in a saline environment. Thus, it was proposed that in order to overcome  $\text{Na}^+$  inhibition of enzyme activity, this organism possessed salt-dependent mechanisms which resulted in increased activity of enzymes pertaining to the central metabolic pathways. However, the nature of the mechanisms involved in augmented enzyme activity was not analyzed. To address this matter, we studied the expression of *DhGDH1* and *DhGLN1* encoding NADP-glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase, respectively, which constitute the central metabolic circuit involved in ammonium assimilation. It was found that: i) expression of *DhGDH1*, was increased when *D. hansenii* was grown in the presence of high NaCl concentrations, while that of *DhGLN1* was reduced, ii) that *DhGDH1* expression in *S. cerevisiae*, takes place in a *GLN3* and *HAP2*, 3-dependent manner and iii) that salt-dependent *DhGDH1* and *DhGLN1* expression involves mechanisms which are limited to *D. hansenii* and not present in *S. cerevisiae*. Thus, salt-dependent regulation of genes involved in central metabolic pathways could form part of a strategy leading to the ability to grow under hypersaline conditions.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. Estrés osmótico en *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras crecen en múltiples ambientes. Pueden utilizar metabolitos como carbohidratos, alcoholes, ácidos orgánicos y aminoácidos como fuente de carbono (Hohmann, 2002). También son capaces de metabolizar sustratos para obtener energía, y algunas pueden formar un cuerpo filamentoso o pseudohifas, infectando plantas y animales, incluyendo al humano. (Gustin *et al.*, 1998; Sánchez y Pérez, 2001; Lengeler *et al.*, 2000).

En su hábitat las levaduras están expuestas a diferentes variaciones del medio ambiente que pueden causarles estrés, como la falta de nutrientes, cambios de temperatura, pH, niveles de oxígeno, y especialmente la variación de agua químicamente libre disponible en solución (actividad de agua). Se ha observado que una baja actividad de agua limita el crecimiento celular, y esta observación ha sido utilizada durante siglos para la preservación de alimentos, como frutas secas o mermeladas, las cuales tienen una baja disponibilidad de agua libre (Hohmann, 2002). Además las levaduras poseen numerosas aplicaciones en la biotecnología tradicional y moderna. Desde la antigüedad se han reconocido como protagonistas en la producción de alimentos y bebidas por fermentación, y actualmente se utilizan como fuentes de obtención de vitaminas del complejo B, pigmentos, cofactores, y en las últimas décadas se han incorporado a la industria biotecnológica como hospederos para la producción de proteínas heterólogas de organismos eucariontes por medio de la ingeniería genética (Gustin *et al.*, 1998; Hohmann, 2002).

Existen levaduras capaces de crecer en ambientes con baja actividad de agua como la levadura marina *Debaryomyces hansenii*, que es capaz de crecer en un ambiente con 4 M de NaCl, en el que la osmosensible *S. cerevisiae* no es capaz de crecer; esto sugiere que estas levaduras poseen diferente capacidad para contrarrestar el efecto tóxico de la sal, y quizá los mecanismos de osmoadaptación sean diferentes, lo que hace importante estudiar los mismos (Blomberg y Adler, 1992; Hohmann, 2002; Norkrans, 1966; Blomberg y Adler, 1992).

Se han descrito estrategias de respuesta celular que tienen como finalidad contrarrestar los diferentes ambientes adversos, permitiendo el crecimiento de las levaduras aún en condiciones de estrés. A nivel celular, esto implica una respuesta rápida, en la cual participan sistemas que detectan cambios externos, que traen como consecuencia la activación de los genes necesarios que permiten responder a condiciones adversas para la célula.

Con el desarrollo de la genética, la biología molecular y el estudio de los genomas, las levaduras se han convertido en una herramienta de experimentación en el laboratorio, que ha permitido conocer los mecanismos involucrados en la respuesta a estrés osmótico. Entre las levaduras más estudiadas se encuentran *S. cerevisiae* la cual ha permitido conocer genes involucrados en la alta osmolaridad (Hohmann, 2002; Millar, 1999; Serrano y Gaxiola, 1994).

A continuación se presenta una descripción de los mecanismos de respuesta al estrés osmótico identificados en la levadura osmosensible *S. cerevisiae*.



### 1.1. La respuesta a estrés osmótico en *S. cerevisiae*.

El estudio de la respuesta celular a diferentes condiciones de estrés de *S. cerevisiae* es uno de los sistemas que ha permitido conocer más sobre los mecanismos involucrados para contender con estos cambios del medio ambiente.

En *S. cerevisiae* la disponibilidad de agua es uno de los factores que limitan la distribución y la sobrevivencia de la misma. La evaporación, el congelamiento, el aporte extra de sales al agua, etc., pueden ocasionar en la levadura deshidratación o hidratación excesiva y causar su lisis. Sin embargo, la levadura puede contrarrestar este efecto a través de la osmoregulación, que se define como la capacidad de las células para ajustar su medio intracelular cuando se presenta una variación externa en la concentración de los solutos del agua.

Para contender con estrés osmótico los osmosensores (Sln1p, Sho1p y Msbp2) son necesarios para activar a la cinasa Hog1 (**H**igh **O**smolarity **G**lycerol) la cual participa en la inducción de los genes necesarios para sobrevivir a alta osmolaridad en *S. cerevisiae* (**Figura1**) (Banuett, 1998; Ruis y Schüller, 1995). Mientras en una condición de hipoosmolaridad, la vía de transducción que se activa es la pKC (protein kinase C) (Hohmann, 2002).

El primer componente identificado en la de respuesta a alta osmolaridad en *S. cerevisiae* fue la proteína Hog1, esencial para que pueda contender con los efectos de estrés osmótico. La proteína Hog1 es parte importante de la **vía HOG** la cual fue descrita por Brewster y colaboradores (1993), estudiando mutantes sensibles a alta osmolaridad. Las mutantes mostraron estar afectadas en los genes *PBS2* y en *HOG1*, una MAP cinasa cinasa y una MAP cinasa, respectivamente. La vía o cascada de señalización de las MAP-cinasas, se

encuentra ampliamente distribuida en los organismos eucariotes y se compone de tres cinasas, la MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK), la MAP cinasa cinasa (MAPKK) y la MAP cinasa (MAPK) (Kültz y Burg, 1998).

Cuando *S. cerevisiae* se expone a un cambio brusco de osmolaridad por arriba de 0.3 M de sal, hay una disminución del volumen celular por pérdida de agua del citoplasma, que activa la vía de la MAPK-HOG1 para contrarrestar la deshidratación y proteger a la célula (Tamás *et al.*, 2000; Varela *et al.*, 1996; Varela *et al.*, 1992). En *S. cerevisiae* la sal más utilizada para aumentar la osmolaridad es el NaCl, siendo el ion sodio tóxico para la levadura, además hay que considerar que el estrés producido por NaCl tiene dos efectos sobre la célula: uno iónico y otro osmótico. Uno de los efectos observados del ion sodio es el aumento transcripcional del gen *ENA1/PMR2*, que codifica para una ATPasa que expulsa el sodio intracelular; otro efecto es la activación de la respuesta llevada a cabo por la vía de calcineurina, una enzima dependiente de calcio y por la vía MAPK- HOG1 (Garcia-deblas *et al.*, 1993; Márquez y Serrano, 1996; Mendoza *et al.*, 1994). Acerca de los genes afectados por el cloruro (Cl<sup>-</sup>) se conoce poco, ya que se ha observado que no entra a las células de *S. cerevisiae* (Connway y Downey, 1950; Coury, *et al.*, 1999). Cabe mencionar que se ha logrado identificar dos proteínas las cuales no llevan a cabo su función por efecto del ión sodio, estas proteínas son producto de los genes, *HAL2* y *RRP2-1*, una fosfatasa que hidroliza al 3-fosfo-adenosín-5-fosfato (PAP), y un componente de la enzima endoribonucleasa procesadora de RNA MRP, respectivamente. Al no llevar a cabo su función en *S. cerevisiae*, las células mueren por acumulación de PAP, y no hay



una maduración de los RNA's ribosomales (Dichtl *et al.*, 1997; Gläser *et al.*, 1993; Murguía *et al.*, 1995; Murgia *et al.*, 1996).

El sistema general para contrarrestar el estrés osmótico ocasionado por cloruro de sodio (NaCl) en *S. cerevisiae*, involucra la expresión de los genes encargados de la síntesis de glicerol, salida de cationes y genes de respuesta general al estrés. El glicerol en *S. cerevisiae* es acumulado y sintetizado, es considerado un osmolito o soluto compatible, que ayuda a contrarrestar el efecto osmótico (Blomberg y Adler, 1992). Los osmolitos son compuestos orgánicos que se acumulan en el citoplasma, y se ha propuesto que se encargan de proteger a las proteínas, formando estructuras que impiden la pérdida de agua, o forman estructuras similares al agua. Entre los principales osmolitos se han encontrado los polialcoholes como glicerol, sorbitol y manito; azúcares como la trehalosa y sacarosa, y aminoácidos como glutamato, prolina y betaina; estos últimos en las bacterias (Brown y Simpson, 1972; Yancey *et al.*, 1982; Gustafsson y Norkrans, 1976). Se ha observado que la doble mutantes de *S. cerevisiae* *gpd1Δ gpp2Δ* no pueden producir glicerol, por lo que son más osmosensibles. El aumento del glicerol se lleva a cabo por dos mecanismos, el primero involucra la disminución de la permeabilidad al glicerol, por inhibición de la proteína Fps1p, un transportador de glicerol, principal determinante en la permeabilidad al glicerol, y el segundo implica un aumento de la transcripción de los genes *GPD1* (NAD-glicerol 3-fosfato deshidrogenasa) y *GPP2* (glicerol 3 fosfatasa), cuyas enzimas están involucradas en la síntesis de glicerol. La activación transcripcional de los genes *GPD1* y *GPP2* depende de la vía MAPK-HOG1 (Sutherland *et al.*, 1997; Rep *et al.*, 1999; Palman *et al.*, 2001).

Como ya se menciona en la activación de la vía MAPK-HOG participan dos proteínas transmembranales, denominadas osmosensores, Sln1 y Sho1 (Ota, y Varshavsky, 1993; Maeda *et al.*, 1994; Maeda *et al.*, 1995). O'Rourke y Herskowitz encontraron un tercer osmosensor, Msb2 implicado en la respuesta a la alta osmolaridad (**Figura 1**). Estos osmosensores cumplen la tarea de transmitir la señal, desencadenando un mecanismo de respuesta que activa a la cinasa Hog1 encargada de activar la transcripción de genes dependientes de esta cinasa (O'Rourke y Herskowitz, 1998, 2000a, 2000b).

El osmosensor Sln1p, una proteína de 1200 aminoácidos, es un regulador negativo de la vía de señalización HOG; tiene dos regiones transmembranales y un dominio citoplasmático de histidina cinasa; este último localizado en el extremo carboxilo. El grupo de Saito y colaboradores (Posas *et al.*, 1996) encontraron que el sistema de señalización Sln1, involucra a las proteínas Ypd1 y Ssk1, que regulan a la proteína Hog1. El osmosensor Sln1 se encuentra activo (fosforilado) en un ambiente con osmolaridad por debajo de 0.1M de NaCl (Maeda *et al.*, 1995), por lo que la proteína Ypd1 es fosforilada por Sln1, y Ypd1 transfiere el fosfato a la proteína Ssk1. La fosforilación de Ssk1 impide la interacción y activación con las MAPKKK Ssk2 y Ssk22, por lo que tampoco son activadas las proteínas MAPKK Pbs2 ni la MAPK Hog1. Cuando la levadura se expone a osmolaridad alta, se inhibe la fosforilación del osmosensor Sln1, y como consecuencia Ypd1 y Ssk1 se desfosforilan, lo cual permite la interacción de la proteína Ssk1 con la MAPKKK Ssk2; esta interacción favorece la autofosforilación de Ssk2, la fosforilación de Pbs2, y finalmente la activación de Hog1 (Posas y Saito, 1998).



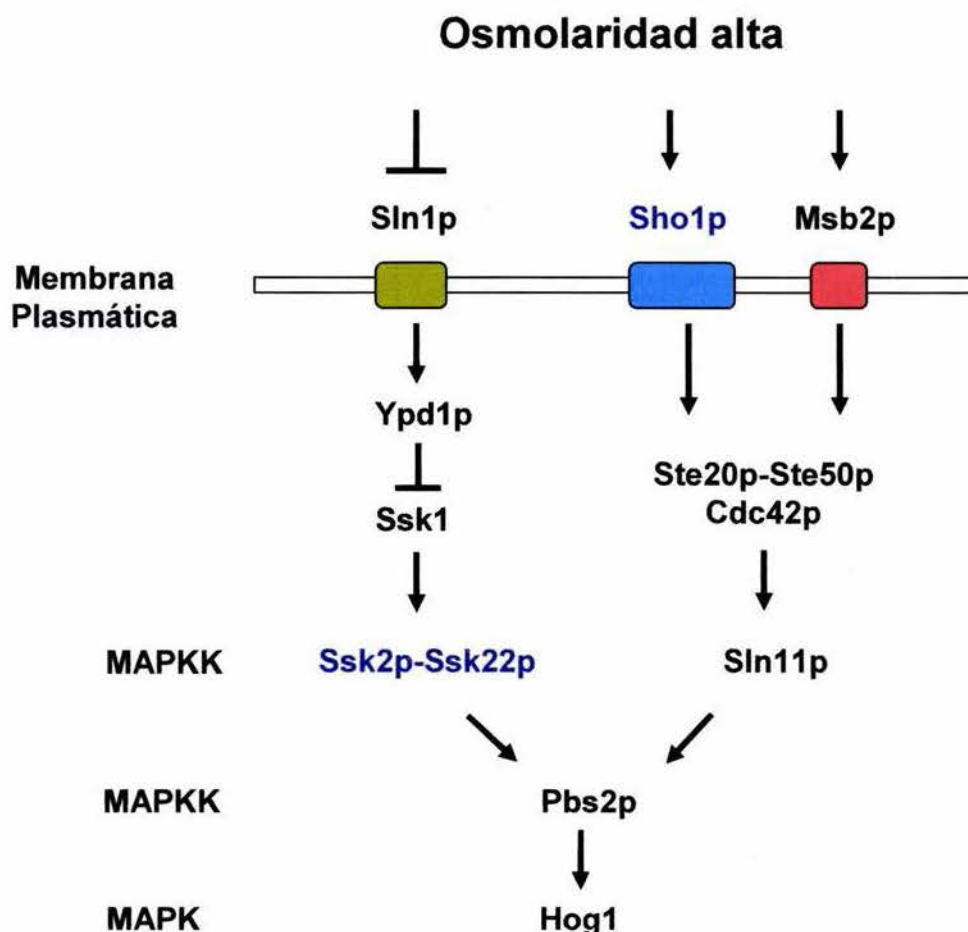
La mutación del gen *SLN1* es letal, ya que la vía de señalización controlada por este osmosensor se mantiene activa, lo que ocasiona que genes que no son necesarios se expresen en una condición de crecimiento carente de estrés osmótico (Ota y Varshavsky, 1993; Maeda *et al.*, 1994).

El segundo osmosensor Sho1, es una proteína de 367 aminoácidos, con cuatro dominios transmembranales, y un dominio citoplasmático SH3, que se une a la región rica en prolina de la MAPKK, Pbs2. Se ha encontrado que en osmolaridad alta, Sho1p requiere la presencia de las proteínas Cdc42, Ste20 y Ste50, las cuales se encargan de la activación de la MAPKK, Pbs2, vía la MAPKKK Ste11 (Posas y Saito, 1997). Se piensa que Cdc42, Ste20 y Ste50 forman un complejo de proteínas que se encarga de la fosforilación de Pbs2, pero no ha sido demostrado (Raitt *et al.*, 2000). Una mutante en el osmosensor Sho1, no es letal, debido a que el osmosensor Sln1 se encuentra activo y solo muestra sensibilidad a sal, cuando además de estar mutado el gen, *SHO1*, se encuentran también mutados los genes *SSK2* y *SSK22* (Maeda *et al.*, 1994).

El tercer osmosensor, Msb2, utiliza las mismas proteínas que el osmosensor Sho1 para activar la vía HOG; esta observación fue hecha por O'Rourke y Herskowitz (1998, 2000a), al encontrar respuesta a la alta osmolaridad en la mutante de *S. cerevisiae* *ssk2 ssk22 sho1*. Por lo tanto la fosforilación de la MAPKK Pbs2 (Ser-514 y Thr-518), es catalizada por cualquiera de las tres MAPKKK, Ste11, Ssk2 ó Ssk22 (Posas *et al.*, 1996; Posas y Saito, 1997, 1998). La fosforilación de Pbs2 activa a la MAPK HOG (Thr-174 y Tyr-176), mediante la fosforilación, la cual es necesaria para que la proteína HOG1 se transporte al núcleo y pueda activar la transcripción de genes dependientes de



Hog1 (**Figura 1**). Se ha demostrado que la fosforilación de los aminoácidos treonina 174 y tirosina 176 de la proteína Hog1 es crucial para la actividad de la cinasa, pero recientemente Bell y su grupo (Bell *et al.*, 2001; Bell y Engelberg, 2003) han encontrado que la fosforilación de la tirosina 176 no es esencial para llevar a cabo su función catalítica de fosforilación, y tampoco tiene efecto sobre su papel de activador transcripcional de genes dependientes de Hog1, mientras que la fosforilación de la treonina 174 es esencial para estas funciones.



**Figura 1.** Vías de activación de la MAPK HOG (Tomada y Modificada de O' Rourke y Herskowitz, 2000b)

## 1.2. Regulación del estado de activación de la proteína Hog1.

La regulación de las proteínas involucradas en las cascadas de señalización implica un mecanismo de fosforilación y desfosforilación (actúan una proteína cinasa y una fosfatasa) para su control, el cual es importante, ya que estas cascadas de señalización participan activamente en un gran número de procesos biológicos. Se ha observado que la fosforilación de la proteína Hog1 involucra un mecanismo transitorio de activación (Maeda *et al.*, 1994). El tiempo que se encuentra fosforilada la proteína Hog1 depende de la severidad del estrés osmótico. Si se da un estrés osmótico de 0.4 M NaCl, la proteína Hog1 es fosforilada en un minuto, y se mantiene fosforilada durante 30 minutos. Si el estrés es más severo, 1.4 M NaCl, la fosforilación de Hog1 muestra a los 30 minutos una máxima fosforilación, que tarda horas en desaparecer (Maeda *et al.*, 1995). Se han encontrado proteínas que interactúan con la cinasa Hog1, dos fosfatasas de fosfotirosinas (Ptp2 y Ptp3), y dos fosfatasas de fosfoserina/treonina (Ptc1 y Ptc3), las cuales controlan los niveles de fosforilación de la proteína Hog1. Además se ha encontrado que el aumento en la expresión de estas fosfatasas suprime la activación constitutiva de la proteína Hog1, de una mutante de *S. cerevisiae* *sho1Δ sln1Δ mbsΔ* (Jacoby *et al.*, 1997; Mattinson y Ota, 2000; Wurgler-Murphy *et al.*, 1997; O'Rourke y Herskowitz, 2000b).

### 1.3. Factores de transcripción asociados a la proteína Hog1

Se ha descrito que la cinasa Hog1 puede interactuar con varios factores de transcripción, como las proteínas, Sko1, Hot1, Msn1, Sgd1, Gcn4, Smp1, Msn2-Msn4, pero sólo se ha demostrado la interacción de la cinasa Hog1 con las proteínas, Sko1, Hot1 y Smp1 (Martínez Pastor *et al.*, 1996; Proft y Serrano, 1999; Alepuz *et al.*, 2001; Proft *et al.*, 2001; Pascual-Ahuir *et al.*, 2001a; Proft y Struhl, 2002) Estos son los factores de transcripción descritos hasta ahora, como los encargados de la activación o represión transcripcional de los genes involucrados en la respuesta al estrés osmótico.

La proteína **Sko1** pertenece a la familia de factores de transcripción que se unen a la secuencia del ADN conocidas como CRE ("cAMP-response element"); este ha sido considerado un represor transcripcional que recluta e interactúa con el complejo represor Tup1-Ssn6 formando un complejo, pero, recientemente se ha visto que este complejo integrado por Sko1-Tup1-Ssn6 puede ser también un complejo que activa la transcripción de genes de respuesta a estrés osmótico. En un ambiente con alta osmolaridad, la cinasa Hog1 fosforila a la proteína Sko1, ocasionando una afinidad reducida por la proteína Tup1, lo cual trae como consecuencia la activación transcripcional del gen *HAL1*, mientras que en un ambiente sin sal (NaCl), la proteína Sko1 tiene una alta afinidad por la proteína Tup1 y por lo tanto la expresión del gen *HAL1* es reprimida (Proft y Struhl, 2002). En mutantes de *S. cerevisiae* *tup1-ssn6* o *sko1*, la expresión de los genes que regulan Sko1 se vuelve constitutiva (Márquez *et al.*, 1998). Entre los genes hasta ahora descritos que controla Sko1 se encuentran los genes, *HAL1* y *ENA1*, que participan en regular la homeóstasis iónica y la salida de sodio de la célula,



respectivamente (Proft y Serrano, 1999; Pascual-Ahuir *et al.*, 2001a; 2001b; Rep *et al.*, 2001; Proft *et al.*, 2001; Proft y Struhl, 2002).

El factor transcripcional **Hot1** fue identificado por medio de la técnica de dos híbridos, se observó que interactúa y es fosforilado por la proteína Hog1 durante estrés osmótico (Alepuz *et al.*, 2001; Rep *et al.*, 1999). La mutación del gen *HOT1* en *S. cerevisiae*, reduce la expresión de los genes *GPD1* Y *GPP2*, los cuales participan en la síntesis de glicerol. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina, se observó que la proteína Hot1 está unida a la región regulatoria del gen *GPD1*, aun cuando la célula no esté en estrés osmótico, lo cual ha sugerido que la fosforilación de la proteína Hot1 por la cinasa Hog1, mejora la unión de la proteína Hot1 a la región regulatoria del gen *GPD1* (Alepuz *et al.*, 2001). La expresión transcripcional de varios genes, entre ellos *GPD1* y *GPP2* implicados en la síntesis osmo-regulada de glicerol, es regulada por Hot1 (Rep *et al.*, 2000).

El factor transcripcional **Smp1** también fue encontrado usando el sistema de dos híbridos, y mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina, se observó que la proteína Smp1 interactúa con la región regulatoria del gen *STL1*. También se demostró que Smp1 es fosforilado por Hog1, lo que favorece su localización nuclear; demostrando que la fosforilación es importante para la función transcripcional de la proteína Smp1 (de Nadal E., *et al.*, 2003).

Los factores transcripcionales **Msn2-Msn4** son dos proteínas homologas; poseen dedos de zinc ( $Zn^{2+}$ ), y se ha demostrado su participación en diferentes condiciones de estrés, incluyendo el estrés osmótico. La participación de Msn2-Msn4 es necesaria para la máxima actividad transcripcional del gen *CTT1* que codifica para la calatasa citosólica. Además se ha determinado que la actividad

transcripcional de Msn2-Msn4 sobre el gen *CTT1* es dependiente de la presencia de la cinasa Hog1. Se ha observado que mutantes carentes de Msn2-Msn4, impiden el reclutamiento de la proteína Hog1 a la región regulatoria de los genes *CTT1* y *HSP12*. Esto sugiere la existencia de la interacción de la cinasa Hog1 con las proteínas Msn2-Msn4 (Alepuz *et al.*, 2001; Martínez-Pastor *et al.*, 1996).

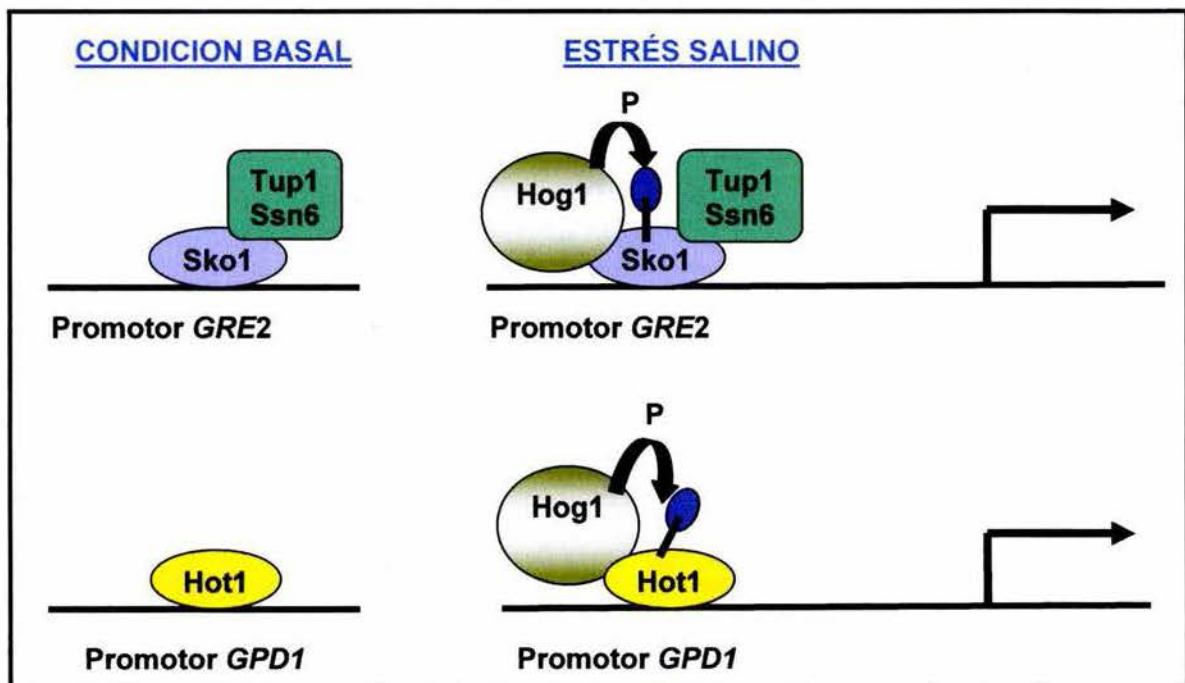
En la **figura 2** se ilustra el mecanismo de activación de los factores de transcripción Sko1 y Hot1 dependiente de la cinasa Hog1. Se puede ver que la activación transcripcional se lleva a cabo cuando los factores transcripcionales, Sko1 y Hot1, son fosforilados por la cinasa Hog1. La duración de la actividad transcripcional mediada por la cinasa Hog1, depende de qué tan severo sea el estrés osmótico y por lo tanto el tiempo que dure la cinasa Hog1 activa (Alepuz *et al.*, 2001; Proft y Struhl, 2002). Como se ha mencionado la cinasa Hog1 tiene un papel importante en la activación de varios genes, pero estudiando la respuesta temprana al estrés osmótico, se encontró que la cinasa Hog1 tiene una nueva función en la respuesta rápida para contrarrestar el estrés osmótico. Esta respuesta involucra la fosforilación de las proteínas, Tok1 (canal de  $K^+$ ) y Nha1 (intercambiador catión/ $H^+$ ) (Proft and Struhl, 2002; Prof and Struhl, 2004). Estos resultados mostraron que la fosforilación de Nha1 es importante para la adaptación inmediata (5-10 min) a estrés osmótico, permitiendo la unión de los activadores transcripcionales (Sko1, Hot1 y Smp1) a sus genes blanco (Prof. and Struhl, 2004).



El factor de transcripción **Gcn4**, regular la expresión de por lo menos cuarenta genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos en *S. cerevisiae* (Hinnebusch, 1993). Este factor transcripcional sólo se ha relacionado con la activación de genes que participan en la biosíntesis de aminoácidos, durante una falta ó privación de algún aminoácidos, pero al estudiar la expresión transcripcional del gen *HAL1*, se observó que la proteína Gcn4 se une a la región regulatoria de este gen. Para evidenciar la importancia de Gcn4 en la expresión del gen *HAL1*, se estudió el fenotipo y la expresión transcripcional del gen *HAL1* en la mutante de *S. cerevisiae gcn4Δ*, esta se cultivó en presencia de sal, y se observó un fenotipo de sensibilidad a sal y la expresión del gen *HAL1*, se reduce, mientras que esto no se observa en la cepa silvestre de *S. cerevisiae* (Pascual-Ahuir *et al.*, 2001a; Gaxiola *et al.*, 1992). Lo que sugiere que Gcn4 podría estar regulando la expresión transcripcional de más genes involucrados en la respuesta a estrés osmótico. Esto se ve apoyado por la sensibilidad a sal que presenta la mutante de *S. cerevisiae gcn4Δ* (Pascual-Ahuir *et al.*, 2001a). Sin embargo este hallazgo se contradice con los resultados de Goossens (Goossens *et al.*, 20001), donde la expresión de la proteína Gcn4 tiene un efecto tóxico, que impide crecer en presencia de NaCl. El efecto tóxico de Gcn4 es contrarrestado por la mutación de la cinasa, Gcn2, la cual se encarga de activar la traducción del gen *GCN4*. Al inhibir la función de la proteína Gcn2, se suspende la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 $\alpha$ , y la transducción de Gcn4, lo que trae como consecuencia que las células se vuelvan resistentes a NaCl. Se ha descrito que Gcn4 se puede unir a dos sitios en *cis* diferentes y quizá estén relacionados con una respuesta diferencial a estrés osmótico y a privación de aminoácidos, durante

privación de aminoácidos el sitio de unión de Gcn4 es, 5'-TGACTC-3' (Hinnebusch, 1993), mientras que el sitio de reconocimiento involucrado en la respuesta a estrés osmótico es, 5'-TGACGT-3' (Pascual-Ahuir *et al.*, 2001a). Por lo que sería interesante estudiar la necesidad de Gcn4 en una condición de estrés osmótico más privación de aminoácidos, en esta condición se podría determinar si Gcn4 aún muestra un efecto tóxico o no lo tiene en presencia de sal.

Así como se ha observado la participación del factor de transcripción, Gcn4, involucrado en estrés osmótico; también se ha descrito la participación de factores transcripcionales, los cuales participan regulando la expresión de genes involucrados en la utilización de diferentes fuentes de nitrógeno, por lo que más adelante se hará una descripción del metabolismo de nitrógeno.



**Figura 2.** Modelo de activación transcripcional mediada por la cinasa Hog1

(Tomado y Modificado de: Proft *et al.*, 2002; de Alepuz *et al.*, 2001)

## **2. Metabolismo afectado por estrés osmótico.**

Se ha analizado la expresión transcripcional de la mayoría de los genes de *S. cerevisiae* mediante la técnica denominada "Microarrays" (microarreglos), observando un aumento de la expresión de más de 200 genes después de someterse al estrés osmótico (Posas *et al.*, 2000; Pep *et al.*, 2000; Yale y Bohner, 2001). De esos genes, aproximadamente 50 dependen de la cinasa Hog1 (Rep *et al.*, 2000). Estos resultados muestran que el estrés osmótico afecta varios procesos celulares, en los cuales participan genes del metabolismo de los carbohidratos, óxido-reducción, aminoácidos, lípidos, glicerol, trehalosa, respuesta general al estrés, componentes de proteínas ribosomales, biosíntesis de proteínas, homeostasis iónica y transducción de señales, por lo que se trata de una respuesta generalizada que la levadura desencadena para sobrevivir. La expresión de algunos de estos genes ya se había observado en trabajos anteriores de respuesta a estrés osmótico (Shüller *et al.*, 1994; Hirayama *et al.*, 1995; Garay-Arroyo y Covarrubias, 1999; Rep *et al.*, 1999). Los genes hasta ahora conocidos son aquellos cuya expresión transcripcional se afecta sólo en un estrés osmótico de pocos minutos, pero no se ha estudiado esta respuesta durante un estrés osmótico durante un crecimiento continuo, el cual alcanzaría la fase logarítmica de crecimiento. A continuación se describe el metabolismo de nitrógeno, en cual participan los factores de transcripción Gln3, Galt1, Dal80, y Deh1, los cuales se encargan de activar o reprimir la expresión transcripcional de genes, cuyos productos participan en la degradación de diferentes fuentes de nitrógeno, pero Crespo y colaboradores en el 2001 encontraron que también participan en la respuesta a estrés osmótico (Crespo *et al.*, 2001).



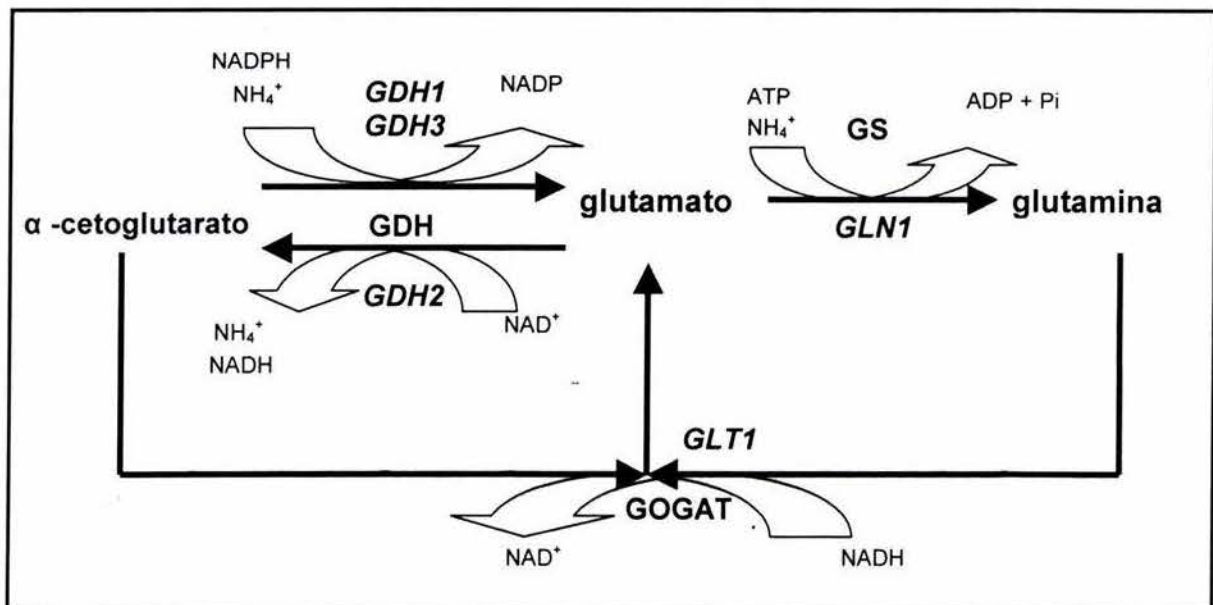
## 2.1. Metabolismo de nitrógeno en *S. cerevisiae*.

Para muchos organismos, el crecimiento y la reproducción están limitados por la disponibilidad del nitrógeno, así como su capacidad para utilizar diferentes fuentes de nitrógeno. Todos los organismos pueden transportar y convertir el amonio ( $\text{NH}_4$ ) en diferentes compuestos con nitrógeno. Sin embargo, no todos los organismos pueden sintetizar amonio a partir de las formas mucho más abundantes de nitrógeno, el gas nitrógeno ( $\text{N}_2$ ), el componente más abundante de la atmósfera terrestre, y el ión nitrato ( $\text{NO}_3$ ), una sustancia que se encuentra en el suelo, la cual es esencial para el crecimiento de la mayoría de las plantas y otros organismos (Marzluf, 1981).

Todos los organismos asimilan amonio a través de reacciones que conducen a la producción de glutamato y glutamina. La levadura *S. cerevisiae* selecciona fuentes primarias de nitrógeno, como el amonio, la glutamina y la asparagina, estas le permiten tener un crecimiento óptimo; mientras la prolina, alantoína y la urea son fuentes secundarias, las cuales no permiten un crecimiento óptimo (Cooper, 2002). Las fuentes primarias son fácilmente transportadas y degradadas, para formar glutamato y glutamina. Cuando *S. cerevisiae* está utilizando una fuente primaria de nitrógeno, los genes necesarios para degradar una fuente secundaria de nitrógeno son reprimidos; a este fenómeno se le conoce como represión catabólica nitrogenada (NCR: Nitrogen Catabolite Repression) (Wiame *et al.*, 1985).

Para la biosíntesis de glutamato y glutamina, *S. cerevisiae* utiliza la enzima glutamato deshidrogenasa (NADP-GDH), que cataliza la aminación reductiva del  $\alpha$ -cetoglutarato más amonio para producir glutamato, mientras que la enzima

glutamino sintetasa (GS), produce glutamina a partir de amonio y glutamato. Además, cuando la fuente de nitrógeno es glutamato, éste es degradado a amonio y  $\alpha$ -cetoglutarato, por la enzima glutamato deshidrogenas (NAD-GDH2) (**Figura 3**). Para determinar que vía es la importante en la asimilación de amonio en *S. cerevisiae*, Deluna y colaboradores estudiaron diferentes mutantes en las vías de asimilación de amonio, observando que una cepa de *S. cerevisiae* *gdh1* $\Delta$ , crecida en glucosa como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno, mostró un tiempo de duplicación mayor a la cepa silvestre; mientras que una cepa mutante en el gen *GLT1*, mostró el mismo tiempo de duplicación que la cepa silvestre. Esto determino que la enzima NADP-GDH1 es la principal vía involucrada en la asimilación de amonio en las condiciones de cultivo estudiadas (Avendaño *et al.*, 1997; DeLuna *et al.*, 2001).



**Figura 3.** Metabolismo central de nitrógeno en *S. cerevisiae*.

### 2.1.1. Factores de transcripción GATA involucrados en la represión catabólica nitrogenada (NCR).

Como ya se mencionó anteriormente la levadura es capaz de seleccionar fuentes primarias de nitrógeno para crecer mejor, por lo que reprime la expresión de genes que se necesitarían para degradar fuentes secundarias de nitrógeno, a este fenómeno se le conoce como represión catabólica nitrogenada (NCR: Nitrogen Catabolite Repression) (Wiame *et al.*, 1985). En la regulación transcripcional de genes involucrados en la represión catabólica nitrogenada participan cuatro factores de transcripción, dos activadores transcripcionales, Gln3, Gat1 (Nil1p), y dos represores transcripcionales, Dal80 y Deh1 (Nil2). Estos reguladores transcripcionales se unen a su secuencia de unión al ADN, llamada: UAS<sub>NTR</sub> (upstream activation sequence, nitrogen regulated), 5'-GAT(A/T)A-3', denominada secuencia GATA. En *S. cerevisiae* muchos genes poseen varios elementos de reconocimiento GATA, pero no significa que todos sean necesarios para activar la transcripción, por ejemplo el gen *DAL5* (codifica para la permeasa de alantoato), en su región regulatoria tiene seis elementos GATA, pero de estos solo son tres necesarios para activar la transcripción (Bysani *et al.*, 1991; Magasanik y Kaiser, 2002; Marzluf, 1997).

En *S. cerevisiae* los factores GATA responden a NCR formando un circuito de regulación, donde Gln3 regula la expresión transcripcional de los factores Gat1, Dal80 y Deh1 (Cooper, 2002; Magasanik y Kaiser, 2002). El factor de transcripción Gln3 tiene un dedo de zinc de Cys<sub>2</sub>/Cys<sub>2</sub>, con el cual se une a su secuencia GATA, es una proteína de 730 aminoácidos (Minehart y Magasanik, 1991). El factor Gln3 regular la expresión transcripcional de los genes que participan en la



utilización de alantoato (*DAL5*, *DAL7*, *URA1* y *DUR2*), y en la biosíntesis de glutamina (*GLN1*). Además de la secuencia GATA, se ha encontrado que la secuencia auxiliar 5'-TTG(G/T)T-3', la cual es también necesaria para la activación transcripcional de los genes *GAP1* (permeasa general de aminoácidos), *GLN1* (glutamino sintetasa) y *GDH2* (NAD-GDH). El activador transcripcional Gat1 presenta una alta homología con Gln3, ambas proteínas poseen una región ácida en el extremo amino, la cual es una característica de los activadores transcripcionales (Ptashne, 1988). Los factores Gln3 y Gat1 participan en diferente grado para activar la transcripción de sus genes blanco, por ejemplo Gln3 y Gat1 pueden regular la expresión transcripcional del gen *GAP1*, mientras que para activar la expresión transcripcional de los genes *GDH2* y *GLN1*, sólo es necesario el factor Gln3 (Coffman *et al.*, 1996; Cooper, 2002; Magasanik y Kaiser, 2002).

Los factores de transcripción Dal80 y Deh1, los cuales son homologos a Gln3 y a Gat1, participan reprimiendo los genes que responden a NCR. Dal80 y Deh1 se unen a la secuencia llamada URS<sub>GATA</sub> (upstrea repressing sequence). Los factores Dal80 y Deh1 además de tener un dedo de zinc tienen un zipper de leucina el cual les permite formar dímeros (Cunningham *et al.*, 1993; Cunningham *et al.*, 1994; Svetlov y Cooper, 1998; Cooper, 2002). Los factores GATA como ya se mencionó se unen a la secuencias 5'-GATA(A/T)G-3', esto hace suponer que tanto los activadores como los represores se unen a las mismas secuencias GATA, pero se ha reportado que para los factores Dal80 y Deh1 se necesitan dos secuencias GATA separadas por 15-35 pb para su unión, mientras que para la unión de los factores Gln3 y Gat1 solo se necesita una secuencia GATA (Rai *et*

*al.*, 1999). Además la proteína codificada por el gen *Dal80*, no reprime a todos los genes que activa Gln3, se ha observado que los factores Gat1 y Gln3 regulan la expresión de los genes *UGA4* (permeasa de GABA- $\gamma$  aminobutírico), y *DAL5*, (permeasa de alantoato), de estos solo la expresión del gen *UGA4* es reprimida por el factor Dal80; esto fue evidenciado al estudiar la expresión transcripcional de estos genes en la mutante de *S. cerevisiae* *gln3 $\Delta$  gat1 $\Delta$  dal80 $\Delta$* , donde la expresión del gen *UGA4* se desreprime, mientras que no la del gen *DAL5*, lo cual sugiere que la regulación positiva de los genes por Gln3 y Gat1, no es necesariamente regulada por los factores Dal80 y Gat1 (Coffman *et al.*, 1996).

La proteína Ure2 se encuentra en el citoplasma unida a los factores de transcripción Gln3 y Gat1, formando los complejos: Ure2-Gln3 o Ure2-Gat1, lo que impide que entren al núcleo. Las buenas fuentes de nitrógeno ocasionan que la proteína Ure2 se encuentre unida a Gln3 y a Gat1, mientras que en presencia de malas fuentes de nitrógeno los factores Gln3 y Gat1 son liberados de la proteína Ure2, pero no es la única proteína involucrada en controlar su localización, Heitman y colaboradores (Courchesne and Magasanik., 1988; Heitman and Hall., 1991a) estudiando el efecto de rapamicina en *S. cerevisiae*, observaron que el crecimiento de la levadura se estacionaba en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, además buscando mutantes resistentes a rapamicina, identificaron dos genes, *TOR1* y *TOR2*, las cuales presentaban un fenotipo de resistencia a rapamicina. Estudiando como rapamicina ocasionaba esos efectos, encontrando que el efecto de inhibición de las proteínas Tor1 y Tor2, es llevado a cabo por la unión de la rapamicina y la proteína Fpr1p formando un complejo que tiene una alta especificidad por las



proteínas TOR (target of rapamycin) (Heitman *et al.*, 1991a; Heitman *et al.*, 1991b; Kunz *et al.*, 1993).

Posteriormente se identificó el papel de la proteína Tor1 en la expresión de genes que responden a NCR, siendo estos los genes más afectados por la rapamicina. Durante el crecimiento en buenas fuentes de nitrógeno la expresión de los genes NCR es reprimida, mientras que en malas fuentes de nitrógeno la expresión de los genes NCR es activada. Se encontró que la rapamicina inhibe a la proteína Tor1, la cual controla a los factores de transcripción Gln3 y Gat1, esto fue encontrado al estudiar la expresión transcripcional de genes reprimidos en presencia de fuentes primarias de nitrógeno más rapamicina, se expresaban, mientras que en una mutante de *S. cerevisiae gln3Δ gat1Δ* más rapamicina no se expresaban, estos resultados evidenciaron la proteína Tor participa en la regulación de los genes que responden a NCR (Stanbrough *et al.*, 1995; Beck and Hall., 1999; Cardenas *et al.*, 1999).

Además de controlar la expresión transcripcional de genes que responden a NCR, la vía TOR también controla la expresión del gene, *ENA1* (ATPasa de sodio). Esta ATPasa de sodio participa en la respuesta a estrés osmótico. Al estudiar el efecto de la rapamicina sobre la expresión de gen *ENA1*, se observó que la rapamicina activa la expresión transcripcional del gen *ENA1*, mientras que este aumento no se observa en la mutante de *S. cerevisiae gln3Δ gat1Δ*. Este resultado demuestra que los factores Gln3 y Gat1 son importantes para activar la transcripción del gen *ENA1*. Además de controlar la localización de los factores de transcripción Gln3 y Gat1, la proteína Tor1 está involucrada en controlar la localización de los factores de transcripción Msn2, Msn4, involucrados en la

respuesta a estrés osmótico (Crespo *et al.*, 2001; Beck and Hall., 1999). También se ha documentado que la vía TOR es activada por los nutrientes y por estrés osmótico, pero el mecanismo por el cual TOR percibe y discrimina la calidad de los nutrientes así como el estrés ambiental, aún se desconoce, lo que trae como consecuencia una falta de conocimiento en respuestas y mecanismos de activación de TOR en *S. cerevisiae*.

La descripción de los mecanismos de osmoregulación en *S. cerevisiae*, involucra la participación de los osmosensores que activan a la quina Hog1 que se encarga de fosforilar y activar a los factores de transcripción encargados de aumentar la expresión de los genes necesarios para contrarrestar el estrés osmótico. Pero además de la respuesta clásica al estrés osmótico, se ha observado que también participan el factor de transcripción, Gcn4, involucrados en la biosíntesis de aminoácidos y los factores, Gln3 y Gat1, que participan en la respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno (NCR). Lo que sugiere una respuesta general que además de la respuesta clásica, involucra a otros componentes para contrarrestar el estrés osmótico en *S. cerevisiae*.

Quizá los mecanismos de osmoregulación importantes para contrarrestar el estrés osmótico en la levadura osmosensible *S. cerevisiae*, no sean los mismos que presenta la levadura halotolerante *D. hansenii*, por lo que esta última representa un modelo de estudio interesante, ya que su ambiente natural de crecimiento implica altas concentraciones de sales, por lo que el estudio de la levadura *D. hansenii*, nos puede permitir entender los mecanismos de halotolerancia de este organismo. A continuación se describen las características de osmoadaptación descritas en *D. hansenii*.



### **3. *Debaryomyces hansenii* un modelo de osmotolerancia**

Entre las primeras investigaciones llevadas a cabo en *D. hansenii* se encuentran los trabajos realizados por Norkrans, enfocados a evaluar los efectos de algunas características fisicoquímicas del agua de mar como la salinidad, el pH, y el efecto de la temperatura, sobre el crecimiento, concentración celular y cinética de acumulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Los resultados mostraron que la levadura marina *D. hansenii* podía crecer hasta 4 M de NaCl, a un pH de 8.1 y a 6<sup>o</sup> C, mientras que levadura osmosensible *S. cerevisiae* fue incapaz de crecer en estas condiciones. Estos resultados sugirieron que *D. hansenii* era una levadura halotolerante. Se observó que en esta levadura, la velocidad de acumulación de potasio era mayor al aumentar la concentración de sodio en el medio, y este aumento no se observó en *S. cerevisiae*, aún después de incubar las células por 20 horas en presencia de concentraciones constantes de sodio. Se observó que al añadir cloruro de sodio al cultivo de *D. hansenii* la acumulación de sodio ocurrió durante los primeros 25 a 30 minutos, pero entre los 60-120 minutos había una pérdida abundante del sodio acumulado; ésto no se observó en *S. cerevisiae*. Estos datos mostraron que *D. hansenii* posee una mayor capacidad para acumular potasio en presencia de sodio, así como una mayor capacidad de expulsar el sodio intracelular (Norkrans, 1966; Norkrans, 1968; Norkrans y Kylin, 1969). La levadura *D. hansenii* fue capaz de crecer en altas concentraciones de sal, por lo que fue considerado un microorganismo halotolerante, término que se emplea para definir a aquellos microorganismos capaces de crecer en presencia y ausencia de altas concentraciones de sal; mientras que los microorganismos halófilos son aquellos que crecen mejor en un ambiente hipersalino de cloruro de



sodio (NaCl). Para los microorganismos halófilos el NaCl no puede ser sustituido por otra sal (Norkrans B, 1968; DasSarma S, *et al* 2001).

Norkrans observó que *D. hansenii* era capaz de crecer en un ambiente alcalino. Hobot y Jennings encontraron que el pH alcalino (aproximadamente 8) era una característica fisicoquímica necesaria para que la levadura marina pudiera capturar mayor cantidad de potasio que de sodio. Esto resulta importante, dado que el agua del mar tiene un pH alcalino (Norkrans, 1966; Hobot y Jennings, 1981).

En trabajos posteriores se identificó el papel de los solutos compatibles o también llamados osmolitos, involucrados en la osmorregulación en *D. hansenii*. Los resultados en *D. hansenii* muestran que el soluto compatible presente como respuesta a altas concentraciones de sal es principalmente el glicerol en la fase logarítmica (log) y el arabinitol en la fase estacionaria de crecimiento. Cuando *D. hansenii* se cultiva en bajas concentraciones de sal (4 mM), y el arabinitol fue el único soluto intracelular acumulado, por lo que se consideró como reserva energética y osmolito (Gustafsson, 1979; Adler y Gustafsson, 1980). Los resultados experimentales de Reed y Jovall (Reed *et al*, 1987; Jovall *et al*, 1990), utilizando glucosa ( $1\text{-}^{13}\text{C}$  y  $6\text{-}^{13}\text{C}$ ) marcada y por medio de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) confirmaron que el glicerol y arabinitol era los principal osmolitos de *D. hansenii*.

Para caracterizar la biosíntesis y asimilación de glicerol en *D. hansenii* se realizó un estudio comparando a la cepa silvestre y a la mutante del gen mitocondrial de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, se encontró que la mutante era incapaz de crecer en presencia de glicerol como fuente de carbono, pero sí

sintetizaba glicerol. También se encontró que el glicerol es transportado al citosol de manera similar en ambas cepas; sin embargo, la mutante fue incapaz de utilizar el glicerol por que carece de la enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa. Esto hizo proponer a los autores que el catabolismo del glicerol en *D. hansenii* se lleva a cabo por la enzima glicerol cinasa y por la enzima mitocondrial glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. Midiendo las actividades enzimáticas, glicerol cinasa y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, observaron que la cepa silvestre mostraba las dos, mientras que la mutante sólo mostró la actividad glicerol cinasa. La determinación de la actividad enzimática de las enzimas que participan en la biosíntesis de glicerol comprobó que la producción del glicerol se lleva a cabo por la reducción de la dihidroxiacetona fosfato por la enzima NAD-glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (citosólica), la cual producen glicerol-3-fosfato, que finalmente por acción de una fosfatasa específica da glicerol. Esta misma vía de biosíntesis de glicerol es utilizada por *S. cerevisiae* y por *Zygosaccharomyces rouxii* (Gancedo *et al* 1968; Edgley y Brown, 1983; Adler *et al.*, 1985; Nilsson y Adler, 1990).

Posteriormente se observó que el estrés osmótico producía un aumento en los niveles de glicerol intracelular en *S. cerevisiae* y en *D. hansenii*, al crecerlas en 1.5 M de NaCl, en donde *D. hansenii* mantiene más glicerol intracelular que *S. cerevisiae*. Se ha descrito que el calor tiene una relación directa con la actividad metabólica, por lo que estudiando la cantidad de calor y la producción de glicerol, *D. hansenii* mostró una correlación entre el aumento de glicerol y la producción de calor en respuesta a altas concentraciones de sal, mientras que esta relación no se observó en *S. cerevisiae*. El calor producido sugiere que aún en alta osmolaridad no se afecta y por lo tanto hay actividad metabólica en *D. hansenii*.



Esto reflejó la eficiencia metabólica de la levadura halotolerante *D. hansenii*, y los datos sugieren que en un ambiente de altas concentraciones de sal (1.35 M), *D. hansenii* es capaz de regular el metabolismo de glicerol, permitiéndole crecer en condiciones de estrés osmótico, mientras que *S. cerevisiae* no lo puede regular (Larsson y Gustafsson, 1987).

En otro trabajo sobre la cinética de producción y acumulación celular de glicerol (André *et al.*, 1988) encontraron que al transferir células de *D. hansenii* de un medio sin sal a un medio de salinidad elevada, la producción y acumulación de glicerol aumentaba proporcionalmente al aumento de la salinidad, y las células crecidas en un medio con salinidad elevada perdían rápidamente glicerol al ser transferidas a un medio de menor salinidad. La mutante en la enzima mitocondrial glicerol 3-fosfato deshidrogenasa de *D. hansenii* (mutante 26-6), fue capaz de crecer en glucosa pero no en glicerol. En la mutante se estudio el efecto del glicerol sobre la tolerancia a diferente cantidad de sal en el medio de cultivo, los resultados mostrarón que la mutante sin glicerol crecía peor que la cepa silvestre en presencia de sal, mientras que si se le agregaba un poco cantidad de glicerol al medio de cultivo (1mM, 5Mm) la mutante 26-6 podía crecer hasta 2.3 M de NaCl. Estos resultados proponen que la acumulación del glicerol en *D. hansenii* es importante y necesaria para la osmotolerancia; además los autores proponen que el aumento del glicerol se debe a una respuesta al estrés osmótico y no iónico, dado que ante el estrés por otros solutos (KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Sacarosa) se observa un incremento similar de glicerol.

La enzima NAD glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (NAD-GDP1), que participa en la biosíntesis de glicerol fue obtenida y purificada por Nilsson y Adler



(1990). Una vez purificada, determinaron el efecto iónico sobre la actividad enzimática NAD-GPD1, y observaron una inhibición con cloruro de sodio (NaCl) y cloruro de potasio (KCl), mientras que el glutamato de sodio o glutamato de potasio no inhibían la actividad enzimática; por ello los autores sugieren que la biosíntesis de glutamato en *D. hansenii* pudiera tener un aumento transitorio que proteja la actividad enzimática NAD-GPD1, lo cual representaría una interesante adaptación fisiológica. Estudiando el transporte de glicerol en *D. hansenii*, Lucas y colaboradores (1990), encontraron que *D. hansenii* posee un transportador sodio-glicerol, lo cual sugiere que este transportador podría estar asociado a la elevada halotolerancia de *D. hansenii*.

Prista *et al.* (1997) estudiaron el efecto de KCl, NaCl y LiCl sobre el crecimiento de *D. hansenii*. Los resultados mostraron que *D. hansenii* es más tolerante al cloruro de sodio (NaCl) y al cloruro de litio (LiCl) que *S. cerevisiae*. El efecto de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  sobre el crecimiento fue similar en *D. hansenii*, lo que sugiere que el sodio no tiene un efecto tóxico sino osmótico, mientras que para *S. cerevisiae* el sodio sí es tóxico en concentraciones menores a las del potasio. La concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular fue de hasta 800 mM en cultivos con 2.5 M de NaCl, sugiriendo que el metabolismo de *D. hansenii* no se afecta por concentraciones elevadas de sal. La capacidad de expulsar el  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$  es similar en *D. hansenii* y en *S. cerevisiae*, lo que sugiere que este mecanismo no es el responsable de la halotolerancia de *D. hansenii*. La principal diferencia observada entre *D. hansenii* y *S. cerevisiae* está dada por el efecto del ión  $\text{Na}^+$  sobre el transportador de potasio ( $\text{K}^+$ ), en *D. hansenii* la presencia del ión  $\text{Na}^+$  favorece el transporte y acumulación de  $\text{K}^+$ , mientras que el ión  $\text{Na}^+$  en *S. cerevisiae* inhibe el

transporte de  $K^+$ . La toxicidad de  $Na^+$  en *S. cerevisiae*, se debe en parte a la inhibición competitiva de la acumulación de  $K^+$ , que tiene como consecuencia una disminución de  $K^+$  intracelular y un aumento en la concentración de  $Na^+$ . Sin embargo, esta estimulación del transporte de  $^{86}Rb^+$  no pudo ser confirmada por González-Hernández *et al.* (2004). Los autores concluyen que aunque *D. hansenii* tenga un mecanismo eficiente para expulsar al sodio y meter potasio, la diferencia principal con *S. cerevisiae* está dada porque el sodio intracelular no es tóxico para *D. hansenii* (Prista *et al.*, 1997; Tokuka, 1993).

Posteriormente Prista y colaboradores observaron en *D. hansenii* un comportamiento muy semejante al observado por Norkrans. *D. hansenii* crece a temperaturas que van de los 8 a los 34 °C y a diferentes valores de pH (3.5 a 8) en presencia de cloruro de sodio 0-2.5 M, mientras que a pH 3.5 u 8 con 0.5 M de NaCl, *S. cerevisiae* no mostró crecimiento (Norkrans, 1966; Prista y Madeira, 1995; Almagro *et al.*, 2000).

Thôme y colaboradores observaron que en presencia de 1 M de KCl ó NaCl, *D. hansenii* muestra un mejor crecimiento; además, la acidez del medio aumenta en presencia de las sales. *D. hansenii* mostró un aumento en la capacidad de captación de  $^{86}Rb^+$  (catión utilizado como homólogo de  $K^+$ ) y de  $^{22}Na^+$  en cultivos con KCl o NaCl. Los niveles de ATP son mayores en las células que crecieron en presencia de KCl o NaCl que en su ausencia, sugiriendo la existencia de tres mecanismos de transporte de iones en *D. hansenii*: a) una ATPasa que contribuye al bombeo de protones, base del transporte de  $K^+$  a través de un uniportador; b) un sistema intercambiador  $K^+/H^+$ ; y c) un sistema intercambiador catión/catión muy rápido (Thôme P., *et al.*, 1998).



Thóme y Trench (1999) analizaron por qué la enzima NAD-GPD de *D. hansenii* aumenta dos veces en presencia de sal, y este evento tal vez se debía a un aumento en la expresión del gen *DhGPD1* o a un aumento de la proteína NAD-GPD. En *S. cerevisiae*, la enzima se detectó en la fase logarítmica del crecimiento, con y sin sal, mientras que en *D. hansenii* sólo se observó en condiciones de choque salino durante la fase de crecimiento exponencial, y no en la fase estacionaria. Al utilizar diferentes concentraciones de NaCl para evaluar la inducción de la enzima NAD-GPD, observaron un aumento en los niveles de la proteína al aumentar la salinidad del cultivo hasta 3 M de NaCl, mientras que a 4 M de NaCl disminuye el nivel de la proteína. También se analizó el nivel de transcripción del gen *DhGPD1*; para ello las células se crecieron en ausencia y en presencia de sal. Los resultados mostraron que sin sal no hay transcrito, y en 0.6 M, 1.5 M y 2.7 M de NaCl se observa un aumento de 2 a 3 veces, con una ligera disminución en 2.7 M de NaCl. También estudiaron la respuesta temporal de inducción de NAD-GPD en un experimento de choque osmótico (NaCl 1.5 M) en *D. hansenii*. Determinaron la expresión del gen *DhGPD1* y los niveles de su proteína. El inmunoblot mostró que la proteína GPD1 era detectable a los 30 minutos después del choque, mientras que el RNA mensajero del gen *DhGPD1* aumenta en los primeros 15 minutos después del choque, manteniendo el nivel hasta los 45 minutos. Los autores sugirieron que la enzima tiene una vida media corta pero es sintetizada por un periodo largo, sobre todo en la fase exponencial de crecimiento (Thóme *et al.*, 1998).

González-Hernández *et al.* (2004) estudiaron las características del transporte de sodio y potasio en la halotolerancia de *D. hansenii*. Observaron que



en presencia de 0.6 M de NaCl ó KCl, *D. hansenii* crece ligeramente mejor, y acumula altas concentraciones de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. Los cultivos realizados en presencia de KCl al ser incubados en presencia de NaCl, pierden rápidamente el K<sup>+</sup> acumulado, y se observa una lenta acumulación del catión presente en el medio de incubación, lo que sugiere la existencia de un canal iónico, sin descartar la participación menor de un intercambiador catión/H<sup>+</sup>. Con los resultados obtenidos, proponen que la adaptación de *D. hansenii* al medio ambiente salino, no parece residir en su capacidad de expulsar sodio, sino probablemente en alguna otra. Tal vez sus sistemas metabólicos le permiten desempeñarse en altas concentraciones de sodio que acumula, otra posibilidad es que el sodio capturado se almacene en la vacuola.

En trabajos recientes se han clonado nueve genes de *D. hansenii*, que codifican para la superóxido dismutasa Cu-Zn (*DhSOD-1*), la citocromo P450 alcano hidroxilasa (*Dh-ALK1* y *Dh-ALK2*), la MAP cinasa *DhHOG1* (High Osmolarity Glycerol pathway), dos ATPasas de Na *DhENA1/ DhENA2*, la MAP cinasa cinasa *DhPBS2*, la enzima orotidín 5' fosfato descarboxilasa *DhURA3* y la enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (*GhGPD1*) (Hernández *et al.*, 1998; Yavad y Loper 1999; Basal y Mondal, 2000; Almagro *et al.*, 2001; Bansal *et al.*, 2001a ; Bansal *et al.*, 2001b; Thóme, 2004).

En *S. cerevisiae* los productos de los genes *HOG1* y *PBS2*, participan en la cascada de señalización de respuesta a un estrés osmótico. El gen *HOG1* codifica para una proteína MAP cinasa que participa en la cascada de señalización de respuesta a alta osmolaridad. El gen *HOG1* fue clonado al transformar con una genoteca de *D. hansenii* a la cepa *S. cerevisiae hog1Δ*, la cual carece de la

función de cinasa Hog1 y es sensible a la sal. El gen *DhHOG1* logró restaurar la función del gen a la cepa *S. cerevisiae hog1Δ*. La misma estrategia fue usada para obtener los genes *DhPBS2*, *DhURA3* y *DhGPD1*, lo que demuestra que un gen de *D. hansenii* puede expresarse y restaurar la función equivalente en otra levadura.

Los estudios hasta ahora realizados en *D. hansenii*, tratan de explicar cómo es capaz de tolerar altas concentraciones de sal (NaCl), estos estudios van desde su comportamiento a diferentes molaridades de NaCl, su capacidad fermentativa, su metabolismo en diferentes fuentes de carbono, su proliferación y su adaptación a diferentes pH's, en presencia de NaCl. Sin embargo, prácticamente no hay estudios de expresión transcripcional de los genes homólogos a aquellos que participan en la respuesta a estrés osmótico en *S. cerevisiae*. Por ello es importante llevarlos a cabo, con objeto de conocer el gen o genes involucrados en la osmoadaptación en *D. hansenii*, que podrían permitir en un futuro producir plantas resistentes a la sal. Esto convierte a *D. hansenii* en un modelo que podría tener aplicaciones importantes en la agricultura, para producir plantas que soporten altas concentraciones de sal.

Con estos antecedentes, nuestro trabajo de investigación se centró en estudiar el efecto del estrés salino en la regulación transcripcional de los genes *DhGDH1* y *DhGLN1*, cuyos productos participan en la asimilación de amonio en la levadura halotolerante *D. hansenii*.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de la respuesta celular a diferentes condiciones de estrés en *S. cerevisiae* ha permitido adentrarse en los mecanismos involucrados en la capacidad limitada de este microorganismo para poder contender con variaciones del medio ambiente. El estudio de los mecanismos de respuesta al estrés osmótico (NaCl) en *S. cerevisiae* es importante para entender los principios básicos de la osmoregulación y la homeostasis iónica. Ha sido importante el conocimiento de los genes involucrados en la respuesta al estrés salino, y la función que desempeñan para contrarrestarlo (Hohmann, 2002). Sin embargo, debe tenerse presente que *S. cerevisiae* posee una tolerancia moderada a la sal, lo que ha llevado a considerar a organismos con mayor halotolerancia como modelos biológicos alternativos para estudiar la osmorregulación y la homeostasis iónica. Un microorganismo que presenta una tolerancia alta a la sal es la levadura marina *Debaryomyces hansenii*, capaz de crecer en ambientes con 4 M de NaCl, mientras que la levadura osmosensible, *S. cerevisiae* no puede crecer en esta condición (Norkrans, 1966; Prista *et al.*, 1997). Las ventajas osmoadaptativas que ha desarrollado la levadura halotolerante, *D. hansenii* pudieran ser diferentes de las encontradas en una levadura como *S. cerevisiae*.

Los mecanismos de respuesta a un ambiente hiperosmótico propuestos para *D. hansenii* son: 1) La expulsión de sodio y captura de potasio por un sistema eficiente de transporte de iones, 2) la acumulación de sodio, sin efecto tóxico, y 3) la acumulación y producción de glicerol (Norkrans y Kylin, 1969; Adler *et al.*, 1985; Nilsson y Adler., 1990; Prista *et al.*, 1997; Thóme *et al.*, 1998). Sin embargo, los mecanismos moleculares que le confieren estas características son desconocidos.



Esto hace a *D. hansenii* un modelo muy interesante para identificar los genes que le permiten contender con las altas concentraciones de sal (NaCl), así como para estudiar los mecanismos de regulación de los mismos.

Recientemente se encontró que la actividad enzimática NADP-glutamato deshidrogenasa de *D. hansenii*, aumenta en presencia de sal (NaCl). Esto se observó al determinar la actividad enzimática NADP-GDH durante el crecimiento en 1 M NaCl o sin sal. Se observa un aumento en la actividad enzimática de cinco veces en presencia de sal. Este aumento en la actividad enzimática puede deberse a: 1) un aumento en la traducción, 2) la activación de la enzima en presencia de sal, y 3) a un incremento en la expresión del gen *DhGDH1* de *D. hansenii*, por efecto de la sal. Al evaluar el efecto iónico en la actividad enzimática NADP-GDH, encontraron que la enzima de *D. hansenii* es más sensible que las dos isoenzimas de *S. cerevisiae*, por lo que es posible que el aumento en la cantidad de algunas enzimas de metabolismo intermediario forme parte de un mecanismo general para contrarrestar el efecto de las altas concentraciones de sal sobre la estabilidad de estas proteínas (Alba-Lois *et al.* 2004).

En virtud de que esta levadura es capaz de crecer acumulando altas concentraciones de  $\text{Na}^+$ , se ha propuesto que *D. hansenii* ha desarrollado mecanismos que le permiten modular las enzimas del metabolismo central no implicadas en la respuesta tradicional al choque osmótico. Con el fin de estudiar esta propuesta, analizamos la expresión de los genes, *DhGDH1* y *DhGLN1* de *D. hansenii*, que codifican para las enzimas glutamato deshidrogenasa (NADP-GDH) y glutamino sintetasa (GS), respectivamente, que participan en la asimilación de amonio. Estas enzimas forman parte del metabolismo central, pero no tiene un

papel en la respuesta al estrés en la levadura *S. cerevisiae*. Por ello nos hemos cuestionado si el incremento de la actividad enzimática NADP-GDH en presencia de sal se debe a un aumento en la expresión del gen *DhGDH1*. Además nos interesa saber si la respuesta transcripcional el gen *DhGLN1* que codifica para la enzima GS, se comporta de la misma manera que el gen *DhGDH1*. Para responder esta pregunta, se complementaron dos cepas de *S. cerevisiae* de genotipos diferentes, una carente de los genes *GDH1* y *GDH3*, y otra carente del gen *GLN1*. Se comprobó que las cepas de *S. cerevisiae* complementadas, llevaran el gen *DhGDH1* o *DhGLN1* de *D. hansenii*. Se estudió la regulación transcripcional de los genes *DhGDH1* y *DhGLN1* en *D. hansenii* y en las cepas complementadas de *S. cerevisiae*, crecidas en diferentes concentraciones de NaCl. Se determinó el efecto de la ausencia de algunos factores de transcripción sobre la expresión del gen *DhGDH1* en la cepa complementada de *S. cerevisiae*. También se localizó en que cromosoma están los genes *DhGDH1*, *GhGLN1*, *D18S* y *DhVMA13* de *D. hansenii*.

### III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El objetivo general del trabajo se centró en estudiar el efecto de distintas concentraciones de cloruro de sodio sobre la expresión de los genes involucrados en la asimilación de amonio en *D. hansenii*.

Se plantearon los siguientes objetivos:

**1. Aislar el gen *DhGDH1* y analizar su funcionalidad al complementar una cepa de *S. cerevisiae* carente de la actividad enzimática NADP-glutamato deshidrogenasa.** Se obtuvo mediante PCR un fragmento de aproximadamente 2700 pb que contenía 1000 pb de la región regulatoria y 1700 pb de la región codificante *DhGDH1*. El fragmento de 2700 pb se clonó en el plásmido pRS316 generando el plásmido pDhGDH1-1; este último se utilizó para complementar a la cepa de *S. cerevisiae*  $\Delta gdh1 \Delta gdh3$ . En la cepa complementada se analizó la funcionalidad del gen *DhGDH1*.

**2. Determinar la importancia de algunos factores de transcripción sobre la expresión del gen *DhGDH1* mediante la fusión del promotor del gen *DhGDH1* al gen-reportero *Lac-Z*.** Se obtuvo un fragmento de 973 pb que probablemente contenía el promotor del gen de *DhGDH1*; se determinó el inicio de transcripción del gen *DhGDH1*. El promotor se fusionó con el gen reportero de la  $\beta$ -galactosidasa en el vector YEp353, y se le utilizó para medir la actividad transcripcional en diferentes condiciones de cultivo. Por medio del análisis de la secuencia del promotor, se determinaron los posibles elementos de regulación en *cis* presentes en la región regulatoria. Se determinó la expresión de *DhGDH1* en la cepa silvestre y en las mutantes de reguladores transcripcionales importantes en la regulación tanto del metabolismo del nitrógeno como del metabolismo del carbono.



**3. Analizar la expresión del gen *DhGDH1* usando concentraciones crecientes de NaCl en *D. hansenii* y en la cepa complementada de *S. cerevisiae*.** Se determinó la expresión del gen *DhGDH1* mediante un ensayo tipo Northern blot.

**4. Aislar el gen *DhGLN1* al complementar a una cepa de *S. cerevisiae* carente del gen *GLN1*, que codifica para la enzima glutamino sintetasa, con la biblioteca genómica de *D. hansenii*.** Para la obtención del gen *DhGLN1*, se transformo la cepa *S. cerevisiae gln1Δ*, con la genoteca de *D. hansenii*. Se obtuvieron plásmidos de las cepas transformantes, se secuenciaron y se determinó que el fragmento secuenciado era el gen *DhGLN1* de *D. hansenii*.

**5. Analizar la expresión del gen *DhGLN1* usando diferentes concentraciones de NaCl en *D. hansenii* y en la cepa complementada de *S. cerevisiae*.** Para determinar la expresión del gen *DhGLN1* se realizó un ensayo tipo Northern blot.

**6. Determinar la expresión de los genes *GDH1* y *GLN1* en la cepa silvestre de *S. cerevisiae*, usando diferentes concentraciones de NaCl.** La determinación de la expresión se realizó mediante un ensayo tipo Northern blot. El ensayo se realizó con RNA total obtenido de células cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de NaCl.

**7. Determinar la localización cromosómica de los genes *DhGDH1* y *DhGLN1*.** Para determinar la localización cromosómica se montó la técnica de electroforesis de cromosomas en campos pulsados.

En el apartado de Materiales y Métodos del **ARTÍCULO** se describen las características de las cepas y plásmidos utilizados en el trabajo experimental, así como la mayor parte de técnicas utilizadas en el trabajo. Las técnicas adicionales no incluidas en el artículo se muestran en el **APÉNDICE I**.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Aislamiento del gen *DhGDH1* de *D. hansenii*.

Por medio de un ensayo de PCR se pudo obtener la región del gen *DhGDH1* que codifica para la NADP glutamato deshidrogenasa. Para el ensayo de PCR se uso como templado ADN genómico de *D. hansenii* Y7426 y se utilizaron los oligonucleótidos heterologos, S1 y S2, los cuales amplifican toda la región codificante del gen *GDH1* de *S. cerevisiae*; empleando las condiciones descritas en materiales y métodos del artículo1. De esta forma se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1.3 Kb, el cual se clonó y se secuencio. El analisis de la secuencia peptídica que se dedujo a partir de este ragmento presentó una homología del 73% y 72% con los los genes de *S. cerevisiae* que codifican para la proteína, *GDH1* y *GDH3*, respectivamente. Por lo tanto esto nos sugería que habíamos clonado un fragmento que contía parte o toda la región codificante de gen *DhGDH1* de *D. hansenii*.

Para la obtención de la región promotora del gen *DhGDH1*, se realizó un ensayo de PCR, utilizando oligonucleótidos (decámeros) al azar y un oligonucleótido diseñado sobre la secuencia del gen *DhGDH1* que ya conocíamos. Los productos de PCR se separaron por medio de electroforésis, fueron transferidos para llevar acabo un ensayo tipo Southern blot. Se identifico un fragmento de la región regulatoria de aproximadamente 1.5 Kb, el cual fue clonado y secuenciado.

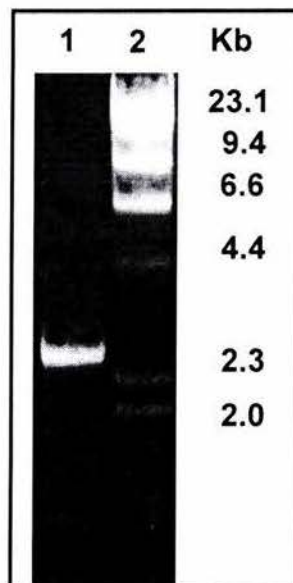
A partir de las secuencias de la región promotora y la región codificante se diseñaron dos oligonucleótidos específicos, uno diseñado sobre la región promotora y el otro diseñado sobre la región codificante del gen; los cuales se



usaron en un ensayo de PCR usando ADN genómico de *D. hansenii* como templado para obtener un solo fragmento que contuviera la región promotora y la región codificante del gen *DhGDH1*. El producto de PCR que se generó fue secuenciado y comparado con la secuencia reportada del gen *GDH1* de *S. cerevisiae*. De esta forma se pudo inferir que las primeras 1000 pb podrían correspondían a la región regulatoria y los 1300 pb restantes codificarían la región codificante del gen *DhGDH1*. El fragmento del gen *DhGDH1* de 2.3Kb se clonó en un vector pRS316 (*CEN6 ARS4 URA3*) generando el plásmido pDhGDH1-0. Con este plásmido se transformó una mutante *gdh1Δ gdh3Δ GLT1* de *S. cerevisiae*, que presenta una auxotrofia parcial por glutamato. El fragmento de 2.3 Kb no complementó a la doble mutante de *S. cerevisiae*. Por esta razón decidimos comparar la secuencia del fragmento de 2.3 Kb con la secuencia total del genoma de *D. hansenii* Y7426 disponible por Genolevures (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/>). De esta forma nos dimos cuenta que había una clona de 1500 pb con la cual compartía homología. Esta clona tenía 33 pb que correspondían al marco abierto, así como 367 pb de la región 3' no traducida que nuestro fragmento de 2.3Kb no tenía. Esto nos sugirió que nuestro gen estaba incompleto, por lo que se decidió obtener a el gen *DhGDH1* completo que sería de aproximadamente 2.7 Kb. Se diseñó un nuevo oligonucleótido sobre la secuencia reportada por Genolevures, y se llevo acabo un nuevo ensayo de PCR usando este oligonucleótido y el anteriormente diseñado sobre la región promotora, el templado del ensayo fue ADN genómico de *D. hansenii*. Con estos oligonucleotidos se obtuvo un producto de 2.7 Kb, que al secuenciar y compara nuevamente con la secuencia reportada del gen *GDH1* de *S. cerevisiae* se pudo deducir que las primeras 1000 pb



corresponden a la región promotora y 1700 pb a la región codificante del gen *DhGDH1* (**Figura 4**). Se realizaron tres reacciones independientes de PCR, para amplificar de manera independiente el fragmento de 2.7 Kb. Estos tres productos obtenidos se clonaron en el vector pRS316 (*CEN6 ARS4 URA3*), generando los plásmidos pDGDH1-1, 2 y 3, estos se usaron para transformar la cepa *S. cerevisiae gdh1 gdh3 GLT1*, con la finalidad de complementar la función enzimática NADP-GDH. Se obtuvieron tres transformantes con cada uno de los plásmidos pDhGDH1, 2 y 3; éstas fueron cultivadas con la finalidad de analizar la funcionalidad del gen *DhGDH1*. Las cepas cultivadas crecían como cepa silvestre, por lo que nos quedamos con una de estas transformantes que contenía el inserto que codificaba para el gen *DhGDH1* de *D. hansenii*.



**Figura 4. Obtención del gen *DhGDH1* de *D. hansenii*.** Electroforesis de productos obtenidos por PCR, utilizando como templado ADN genómico de *D. hansenii*. Carril 1 producto de aproximadamente 2.7Kb. Carril 2 marcador de peso molecular  $\lambda$ *Hind III*.

### 1.1. Análisis de la funcionalidad del gen *DhGDH1* en la cepa de *S. cerevisiae* *gdh1Δ gdh3Δ GLT1* transformada con el plásmido pDhGDH1-1.

Para determinar si el gen *DhGDH1* en la cepa transformada *S. cerevisiae* *gdh1Δ gdh3Δ GLT1* (CLA14) era capaz de complementar la función enzimática NADP-GDH. La cepa CLA14 fue cultivada en medio MM (medio mínimo- 0.75% de NH<sub>4</sub>), y se observó un fenotipo silvestre de crecimiento en la cepa CLA1 (S. *cerevisiae* *GDH1 GDH3 ura3Δ leu2Δ*) y en la cepa CLA14 transformada con el plásmido pDhGDH1-1, mientras que la cepa control CLA14 sin complementar ó con el vector vacío pRS316 tuvieron un tiempo de duplicación, mayor al de la cepa silvestre y a la complementada (**Figura 5a**).

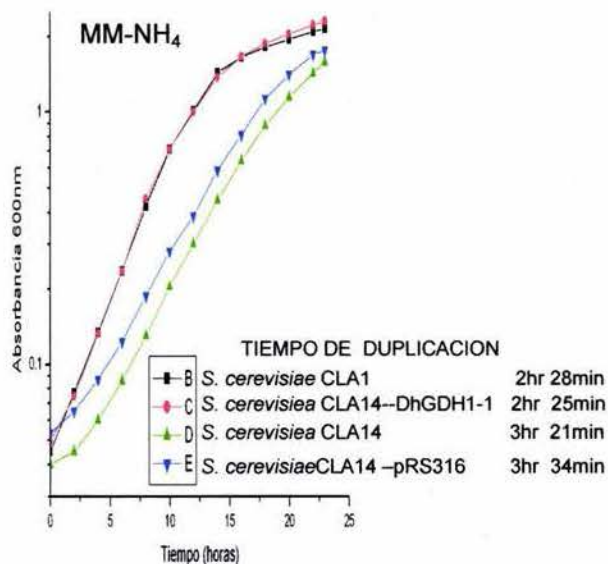
Se ha observado que la enzima NADP-glutamato deshidrogenasa de *D. hansenii* es más sensible a la sal que las enzimas GDH1p y GDH3p de *S. cerevisiae*, por lo que esta sensibilidad quizá este relacionada con el incremento de la actividad enzimática, permitiéndole a la enzima NADP-GDH1 llevar acabo su función en alta osmolaridad y por lo tanto la sal no tiene efecto sobre el fenotipo de crecimiento de *D. hansenii* (Alba-Lois., *et al.*, 2004).

Con el proposito de averiguar si el gen *DhGDH1* que se encuentra presente en la cepa complementada de *S. cerevisiae* (CLA14-pDhGDH1-1) era capaz de restaura el fenotipo silvestre en presencia de sal. Las cepas se cultivaron en medio mínimo con 0.6M de NaCl obteniendo las curvas de crecimiento. Estos ensayos nos permitieron establecer que el gen *DhGDH1* fue capaz de restaurar el fenotipo silvestre de crecimiento en la cepa CLA14 trasformada con el vector pDhGDH1-1, mientras que la cepa CLA14 sin complementar o con el vector vacío mostraron un tiempo de duplicación mayor (**Figura 5b**). Esto nos sugiere que el

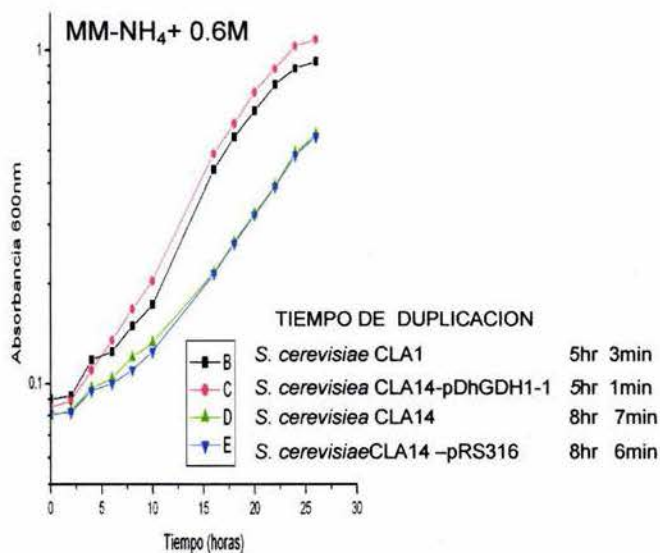
gen *DhGDH1* fue capaz de restaurar el fenotipo de crecimiento de la cepa CLA14, tanto en medio mínimo sin sal como con sal, aunque no le confiere mayor resistencia. Este resultado es muy interesante ya que ha sido reportado que la enzima GDH1p de *S. cerevisiae* es la responsable de la biosíntesis del ácido glutámico en cultivos con glucosa como fuente de carbono. Esto aunado a que una mutante de *S. cerevisiae* *gdh1Δ*, presenta un tiempo de duplicación mayor que el de la cepa silvestre. Esto indica que en esta condición la enzima Gdh1p, es responsable de la biosíntesis de ácido glutámico (DeLuna A., *et al.*, 2001). Por lo que el hecho que el gen *DhGDH1* restaure el fenotipo silvestre de crecimiento en la cepa que carece de sus homólogos, indica que la enzima DhGdh1p restaura totalmente la capacidad de la enzima Gdh1p de *S. cerevisiae* permitiendo un tiempo de duplicación similar a la cepa silvestre. Esto hace suponer que la principal vía de biosíntesis de glutámico en *D. hansenii* es llevada a cabo también por la enzima DhGDH1p y por lo tanto es la vía responsable de la biosíntesis de ácido glutámico.

Una vez que se determinó que el gen *DhGDH1* restauró el fenotipo silvestre en la cepa transformada, el siguiente paso fue analizar la actividad enzimática de NADP-glutamato deshidrogenasa en la cepa complementada o transformada con el gen *DhGDH1*.





**Figura 5a**



**Figura 5b**

**Figura 5. Curvas de crecimiento de la cepa CLA14 (*S. cerevisiae gdh1Δ gdh3Δ GLT1*) transformada con el vector pDhGDH1-1.** La cepa silvestre CLA1 y la transformante se crecieron en medio mínimo (MM-NH<sub>4</sub>) (**Figura 5a**) y en medio mínimo más 0.6M de NaCl (**Figura 5b**). Las cepas se inocularon de un precultivo incubado durante toda la noche. La DO. (600nm) de los inóculos fue de aproximadamente 0.05 y 0.08, las lecturas de la curva de crecimiento se tomaron cada 2 horas.

## 1.2. Actividad enzimática NADP-GDH en la cepa de *S. cerevisiae gdh1Δ gdh3Δ GLT1* transformada con el plásmido pDhGDH1-1.

La actividad específica de la enzima NADP-glutamato deshidrogenasa se determinó empleando extractos de proteínas obtenidos de las cepas transformadas con el gen *DhGDH1* crecidas en medio mínimo (**Tabla 1**). Los resultados mostraron una actividad específica cinco veces mayor en la cepa silvestre de *S. cerevisiae* que en *D. hansenii*, lo que sugiere que utilizando amonio como fuente de nitrógeno *D. hansenii* muestra una actividad enzimática menor a la observada en *S. cerevisiae*. La actividad enzimática en los extractos de proteínas

observada en *S. cerevisiae*. La actividad enzimática en los extractos de proteínas de la cepa *S. cerevisiae gdh1Δ gdh3 Δ GLT1* complementada con el gen *DhGDH1*, mostró una actividad promedio de 1.31, la cual fue diez veces mayor a la obtenida en *D. hansenii*, lo que indica que la expresión limitada del gen *DhGDH1*, fue mejorada en el fondo genético de *S. cerevisiae*. La actividad enzimática en la cepa transformada es dos veces mayor a la determinada en la cepa silvestre de *S. cerevisiae*, y esto no se debe al efecto en el número de copia del vector, ya que se trata de un vector con bajo número de copia.

También se determinó la actividad enzimática NADP-glutamato deshidrogenasa en cultivos crecidos en medio mínimo mas 0.6 M de NaCl. Como ya ha sido reportado, la actividad enzimática en *D. hansenii* se incrementó más de dos veces en presencia de 0.6 M de sal (Alba-Lois, *et al.*, 2004); mientras que, los extractos de proteínas obtenidos de la cepa de *S. cerevisiae* transformada con el gen *DhGDH1* y crecida en 0.6 M de sal mostraron una actividad de cuatro veces menor que la observada en una condición sin sal (**Tabla 1**). Esto sugiere que la enzima DhGdh1p codificada por el gen *DhGDH1* es sensible a la sal o tal vez que la expresión del gen *DhGDH1* disminuye cuando las células son crecidas en alta osmolaridad en *S. cerevisiae*. Sin embargo, la cepa complementada es capaz de crecer como una cepa silvestre en presencia de sal, indicando que la actividad enzimática es capaz de restaurar la poza de ácido glutámico (**Figura 5b**). Estos resultados indican que el gen *DhGDH1* de *D. hansenii* codifica para una NADP glutamato deshidrogenasa, capaz de complementar la función enzimática NADP-GDH1 en *S. cerevisiae*, el cual fue expresado en el fondo genético de *S. cerevisiae*.

Una vez que se determinó la actividad enzimática, decidimos identificar la proteína NADP-GDH responsable de esta actividad en la cepa complementada mediante un ensayo tipo Western blot.

**TABLA 1. Fenotipo de crecimiento y actividad específica NADP-glutamato deshidrogenasa.**

	TIEMPO DE DUPLICACIÓN		ACTIVIDAD ESPECÍFICA NADP-GDH	
	NH <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> + 0.6M NaCl	NH <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> + 0.6M NaCl
Y7426 ( <i>DhGDH1</i> )	6.05	6.00	0.12	0.29
CLA1 ( <i>GDH1 GDH3 ura3 Δ</i> )	2.28	5.00	0.64	0.48
CLA14 ( <i>gdh1Δ gdh3 Δ</i> )	3.21	8.00	nd	nd
CLA14 ( <i>gdh1Δ gdh3Δ / pRS316</i> )	3.34	8.00	nd	nd
CLA14 ( <i>gdh1Δ gdh3 Δ / pDhGDH1-1</i> )	2.25	5.00	1.31	0.34

nd – no detectable.

**Tabla1. Determinación de actividad enzimática de NADP-glutamato deshidrogenasa de la cepa transformada con el gen *DhGDH1*.** Las cepas fueron crecidas en medio mínimo y medio mínimo más 0.6M de NaCl. Los extractos de proteínas totales para la medición enzimática, se obtuvieron de cultivos en fase de crecimiento logarítmico (DO. 0.5- 0.6). El sulfato de amonio se utilizó al 0.75%. La actividad enzimática se determinó por el método de Doherty. Resultados de tres experimentos independientes con una variación menor al 15%.



### 1.3. Reconocimiento antigénico de la proteína NADP-glutamato deshidrogenasa en la cepa de *S. cerevisiae* *gdh1Δ gdh3Δ GLT1* transformada con el plásmido pDhGDH1-1.

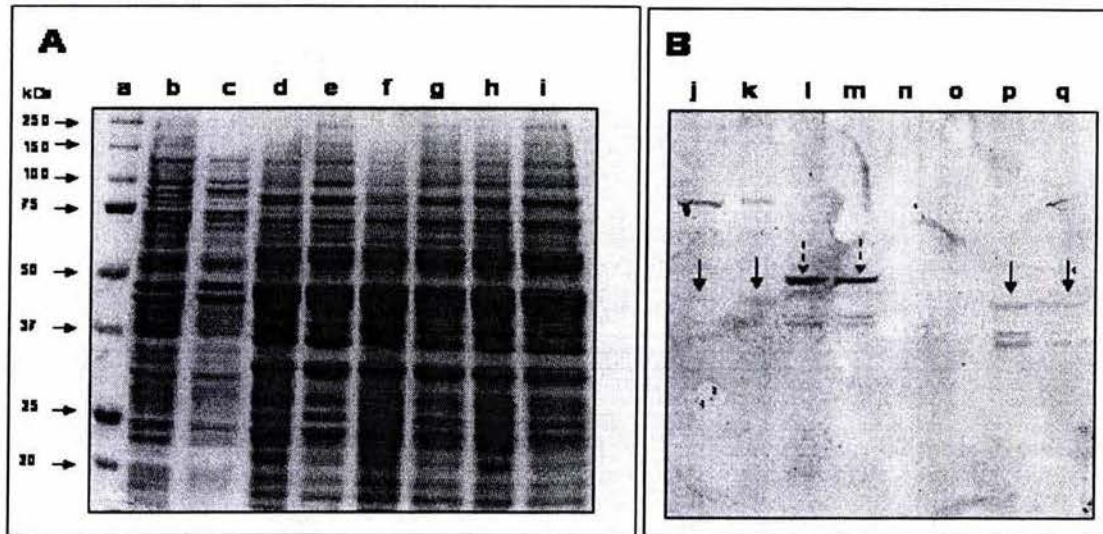
Para identificar la presencia de la proteína NADP-glutamato deshidrogenasa en *D. hansenii* (NADP-GDH) y en las cepas transformadas de *S. cerevisiae*, se usó un anticuerpo anti-GDH1 obtenido de conejos inmunizados con la proteína NADP-glutamato deshidrogenasa de *S. cerevisiae*, el cual ya se ha probado en nuestro laboratorio (DeLuna A., *et al.*, 2001).

Se llevo a cabo un ensayo tipo Western blot para analizar si el anticuerpo heterólogo de *S. cerevisiae* daba reacción cruzada con la proteína NADP-GDH de *D. hansenii*, el ensayo mostró un reconocimiento antigénico de una sola proteína de aproximadamente 48kDa, en un extracto total de proteínas de *D. hansenii* (**Figura 6B** carril j, k), estos resultados nos hace suponer que *D. hansenii* posee un solo gene que codifica para la proteína NADP-GDH. Esto se ve apoyado porque al realizar una búsqueda de secuencias homologas a *DhGDH1* en el banco de datos del genoma de *D. hansenii* liberada por Genolevures no se encontró homologia con ningun otro gen *DhGDH* (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/>).

El anticuerpo anti-GDH de *S. cerevisiae* fue capaz de reconocer a la proteína Gdh1p de aproximadamente 49 kDa de *S. cerevisiae* (**Figura 6B** carril l, m). También se utilizaron extractos crudos provenientes de la cepa de *S. cerevisiae* que contenía el gen *DhGDH1* de *D. hansenii*, con la finalidad de identificar a la proteína responsable de la actividad enzimática (**Figura 6B**. carril p, q). El reconocimiento antigénico nos reveló la presencia una proteína de 48 kDa que migra a la misma altura que presenta la cepa silvestre de *D. hansenii* (**Figura**

**6B.** carril p, q). Como era de esperarse esta proteína no esta presente en la cepa CLA14 sin transformar (**Figura 6B.** carril n, o). Con base en los resultados de la Figura 5 podemos decir que la proteína NADP-GDH que se expresa y es la responsable de la actividad enzimática en la cepa complementada es la proteína de 48 kDa de *D. hansenii* y que además el anticuerpo heterólogo anti-GDH de *S. cerevisiae* era capaz de reconocer a la proteína NADP-GDH1 de *D. hansenii*.

Una vez que se determino que la enzima NADP-GDH1 de *D. hansenii* fue capaz de restaurar el fenotipo silvestre de la mutante CLA14, tanto en una condición sin sal como con sal. Nos interesó averiguar si la expresión del gen *DhGDH1* en *S. cerevisiae*, dependia de algunos factores de transcripción capaces de reconocer sitios *cis* en el promotor de *DhGDH1*. Como no conocíamos el tamaño de la región regulatoria del gen *DhGDH1*, se procedió a realizar un ensayo de "Primer Extensión" para determinar el inicio de la transcripción (sitio +1), considerando que el promotor del gen *DhGDH1* era el fragmento que estuviera ubicado río arriba del inicio de transcripción.



**Figura 6. Inmunoblot de la proteína NADP-GDH.** Células crecidas en medio mínimo y en medio mínimo mas NaCl 0.6M. Los extractos de proteínas se obtuvieron de cultivos en crecimiento logarítmico (DO. 0.6). La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el método de Lowry. Electroforésis en gel SDS-PAGE al 10%, se cargaron 50  $\mu$ g de proteínas totales por carril. **(6A)** Un gel se sometió a Tinción con Azul de Coomassie y otro se transfirió para realizar el inmunoblot. **(6B)** El anticuerpo anti-GDH1 se utilizó con un título 1:2000. Carriles b, d, f, h, j, l, n y p son cepas crecidas en medio mínimo; carriles c, e, g, i, k, m, o y q son cepas crecidas en medio mínimo más 0.6M NaCl. Carril a. Peso Molecular en kDa, Carril b, c, j, k. *D. hansenii* Y7426. Carril d, e, l, m. *S. cerevisiae* cepa *silvestre*. Carril f, g, n, o. *S. cerevisiae gdh1 gdh3 GLT1*. Carril h, i, p, q. *S. cerevisiae gdh1 gdh3 GLT1 + pDhGDH1*. Con las flechas continuas y sólidas identificamos a la proteína NADP-glutamato deshidrogenasa de *D. hansenii*; con la flecha discontinua identificamos a la proteína de *S. cerevisiae*.

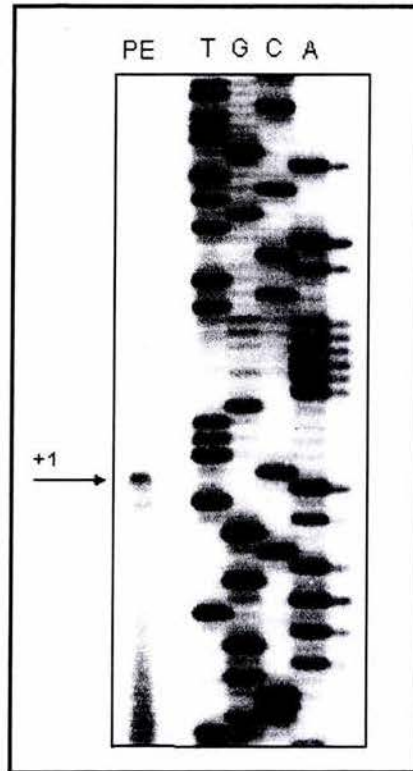


## 2. Determinación del sitio de inicio de transcripción (sit) del gen *DhGDH1*.

Para definir la región regulatoria y poder ubicar algunos sitios putativos de unión para factores de transcripción del gen *DhGDH1* que pudieran regular su expresión. Inicialmente procedimos a determinar el sitio de inicio de transcripción para ubicar la región regulatoria del gen *DhGDH1*

Por medio de la técnica de “*Primer Extensión*” (Sambrook et al., 1989), se determinó el sitio de inicio de transcripción del gen *DhGDH1*. Para este ensayo se utilizó RNA total de la levadura *D. hansenii* Y7426, crecida en medio YPD, el desoxioligonucleótido utilizado se diseñó conteniendo los primeros 21 pb de la región codificante del gen *DhGDH1*; como se muestra en la **figura 7** en donde de acuerdo al producto obtenido el sit se ubica a 40 pb río arriba del inicio de traducción ATG. Estos resultados nos permitieron establecer que la región promotora que se encuentra presente en el inserto de 2.7 Kb es de 973pb.

Una vez que se identificó la región promotora, se procedió a buscar los sitios posibles de unión para factores de transcripción, involucrados en la regulación transcripcional del gen *DhGDH1* de acuerdo a los que han sido reportado para el gen *GDH1* de *S. cerevisiae*.



**Figura 7. Inicio de transcripción de *DhGDH1*.** Se muestra el resultado del análisis del inicio de transcripción de *DhGDH1* por medio del ensayo "Primer Extensión". Para la realización de este ensayo se obtuvo el RNA total de *D. hansenii* crecida en medio YPD. Para la reacción de secuencia se empleó el mismo desoxiligonucleótido utilizado en la reacción de "Primer Extensión" y como templado el plásmido pDhGDH1-1.

## 2.1. Efecto de los reguladores transcripcionales sobre la expresión transcripcional del gen *DhGDH1* en *S. cerevisiae*.

Una vez que sabíamos que los 973 pb río arriba del sit correspondían a la región promotora del gen *DhGDH1* se buscaron los posibles sitios de unión para factores de transcripción. Estos sitios probables de unión para factores de transcripción fueron identificados usando el programa RSA "tools" (<http://embnet.cifn.unam.mx/rsa/tools>).

De esta forma identificamos dos putativos sitios de unión para el factor Gcn4 (TGACTC), el cual participa en regular la biosíntesis de aminoácidos (Hunnebusch G.A., y Natarajan Krishnamurthy., 2002); por lo que probablemente un factor similar a Gcn4 pudiera regular la expresión del gen *DhGDH1*. Sin embargo, en *S. cerevisiae* se ha encontrado que el gen *GDH1* posee varios sitios de unión para Gcn4, pero su expresión no es inducida en una condición de privación de aminoácidos, lo cual indica que la expresión de *GDH1* no es dependiente de Gcn4. También se encontraron cuatro elementos putativos de unión para Gln3, Gat1/Nil1p (GATAA), así como cinco elementos de unión para el complejo proteico HAP (TAACC), los cuales regulan genes que responden a nitrógeno, y a fuentes de carbono no fermentables, respectivamente. Por lo que para evaluar si los factores Gln3 y HAP podrían participar regulando la actividad promotora del gen *DhGDH1* de *D. hansenii* decidimos transfectar la región promotora de *D. hansenii* en cepas de *S. cerevisiae* que eran mutantes para los factores de transcripción Gln3, HAP2p y HAP3p. De tal manera que si la unión de estos factores a los elementos en *cis* presentes en el promotor de gen *DhGDH1* de *D. hansenii* eran indispensables nosotros hicimos a observar una baja



actividad del través del gen reportero  $\beta$  galactosidasa, y si estos no eran indispensables deberíamos observar una actividad similar al promotor del gen *DhGDH1* de *D. hansenii* el cual se transfecto en *S. cerevisiae* cepa silvestre para estos factores de transcripción (plásmido pDhGDH1-2{pDhGDH1- LACZ}) (**Figura 8 y 9**).

Se encontró que la expresión del gen *DhGDH1* depende de la fuente de nitrógeno, el cual se encuentra reprimido en buenas fuentes de nitrógeno tales como amonio y asparagina y desreprimido en prolina que es una mala fuente de nitrógeno. La expresión de la  $\beta$  galactosidasa en la cepa de *S. cerevisiae gln3Δ*, transformada con el vector pDhGDH1-2, disminuye al 50 % en las diferentes fuentes de nitrógeno probadas, al compararse con la cepa silvestre de *S. cerevisiae* (**Figura 9**). La expresión del gen *DhGDH1* también fue analizada en la cepa *S. cerevisiae gdh1Δ gdh3Δ* transformada con el plásmido pDhGDH1-2, observándose una expresión cinco veces mayor a la observada en la cepa silvestre CLA1. Estos resultados sugieren que al igual que en *S. cerevisiae*, la expresión de *DhGDH1* pudiera reprimirse por glutamato, por lo que glutamato podría ser un regulador negativo que modula la expresión del gen *DhGDH1*.

Cuando la actividad de  $\beta$  galactosidasa fue determinada en *S. cerevisiae hap2Δ* o *hap3Δ*, transformadas con pDhGDH1-2, se observó un 50% de actividad para la cepa *hap3Δ*. Mientras que en la cepa *hap2Δ* su actividad fue menor de aproximadamente un 30% (**Figura 9**). Esto sugiere que la expresión del gen *DhGDH1* es regulada por el complejo HAP, muy parecido a lo encontrado en el gen *GDH1* de *S. cerevisiae*.

Una vez que se demostró la funcionalidad del gen *DhGDH1* (tiempo de duplicación, actividad enzimática y presencia de la proteína NADP-GDH) y la dependencia de los factores de transcripción Gln3 y del complejo HAP, en la cepa transformada de *S. cerevisiae* con el gen *DhGDH1*; decidimos estudiar si la expresión transcripcional del gen *DhGDH1* se modifica al cultivar a la cepa transformada de *S. cerevisiae* con el gen *DhGDH1*, utilizando diferentes concentraciones de sal (NaCl). Quizás la expresión transcripcional del gen *DhGDH1* de *D. hansenii*, es dependiente de los cuatro elementos STRE (CCCCT) o por los cinco elementos PDS (CCCT), encontrados en la región promotora del gen *DhGDh1* de *D. hansenii*.

Se sabe que los sitios STRE (CCCCT) y los sitios PDS (CCCT) participan en la respuesta a estrés en *S. cerevisiae*. Nosotros quisimos averiguar si los cuatro sitios STRE y los cinco sitios PDS presentes en el promotor del gen *DhGDH1* podrían regular la expresión del gen *DhGDH1* ya sea activándola o reprimiéndola ante una condición de alta sal. Para esto procedimos a realizar ensayos Northern Blot utilizando el RNA obtenido de la cepa silvestre de *D. hansenii* y la cepa CLA14-pDhGDH1-1.

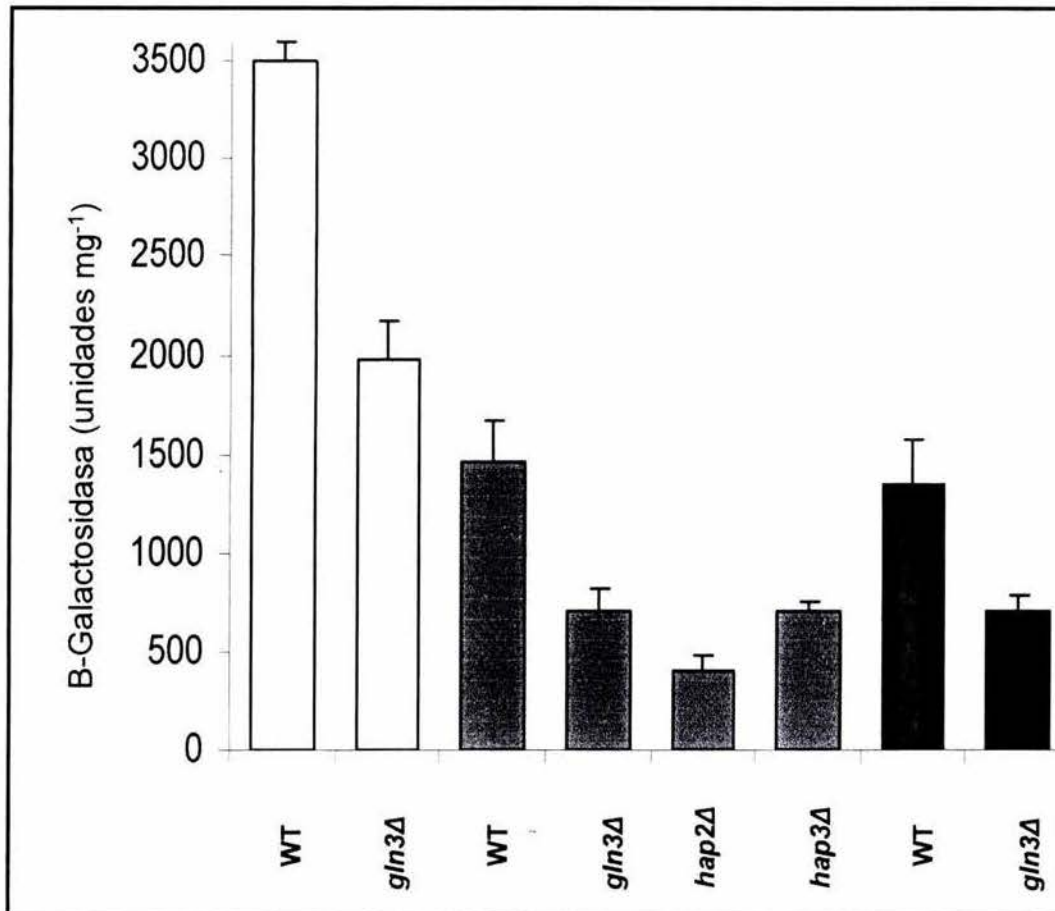
```

EcoRI          STRE(1)          -850
GAATCCCCCATGAATCCCCCTAACCCCCACCATTAOCTTTTCACCGGGACTCATTTTTCG
CTTAAGGGTACTTAAAGGGAAATTGGGGGTGTAATGGAAAAGTGGCCOCTGACTAAAAGC
-840          GATA(1)          PDS(1)
GGGTACAACCTGAGAGGTAAGCTATCCATGCCATAACGAATATAACGATCTCTCTCCCTAT
CCCATGTTGACTCTCCATTGCATAGGTACGGTATTGCTCTATTGCTAGAGAGACGGGATA
PDS(2,3)      STRE(2) PDS(4)          STRE(3)
TAGGGCCCTTGTTCCCCCCCCCTGTTCCCCTGGCCGACCGCGTCAAATATACTAGGGTTT
ACCCCGGGAACAAGGGGGGGGACAAAGGGAGCCGGCTGCCGGCAGTTTATATGACCCCAAA
-720          GATA(2)
GGTTGCACCACAAAAAGTTGCTACCCCACTGTGCACAAAGATCCATACACGATAAAACG
CCAAAGCTGCTTTTGCAGCATGGGGTACACGCTTTCTAGGTATGTGGCTATTTTGC
-640 HAP(1)          -610
ATACACCAATCATTGGTCCCATTCCCCAATTGCCGTATTGCTTCTCTGCTGGTTTGCAT
TATGTGGTTAGTAAGGCCAGGGTAAGCCGTTAGACGGCATAACGAAACGAAGCACCAAAAGCT
-600          -550
CTGGTTGCACCTATTTGACCTGACCTGTTTCCCGTGGSCAAACCTAGTCCGTCGACAGTG
GACCAACGTGGATAAACTGGACTGGACAAAGGGCCCGCTTTGGATCAGGCAGCTGTGCAC
STRE(4)      HAP(2)
CCCCGGAATCCTCACCAATTGTATACTCAACCGATCGTATCCTATCGATCGTCTCCCTATT
GGGACTTAGGACTGGTTAACATATGAGTTGGCTAGCATAGGATAGCTAGCAGAGGATAA
-480          -430
GATCGTATACTACCGATTGCTACTACCCATATCCTCGTCTAATCGGTGGTAGCCCTTCT
CTAGCATATGATGGCTAACAGATGATGGGTATAGGAGCAGATTAGCCAGCATCGGAAAGA
-420          -370
GTCCGGCCACTCATTCCGGCAATTCGGGTACCAAGCTATTTGCTCGCTTCCTATATTTTC
CAGCCGGTGAAGTAAAGCCGTTAAGACGCATGGTTGGATAAACGAGCGAAGGATATAAAG
HAP(3)          GATA(3)          -310
CGAAGATTGGATGACTTAGAACCCCTTGATTGGCACGATAAAAAAAATTACATAATCCA
GCTTCTAACTACTGAATCTTGGGCAACTAAACCGTGACTATTTCTTAAATGTATTAGT
-300 HAP(4)          -250
TATCCACCAATCATGCTGATTCAACCGTTGATCATGGAATCCTGTGACTCGGAAGAAAA
ATAGGTGGTTAGTACGACTAAGTTGGCAACTAGTAGCTTAGGACACTGAGCCCTCTTTT
-240          -190
AGGCAATTGAACAATTCCTTGAAGTCACTCGGTGATTTTGTGTAACCTCCGCTACAGGCGA
TCCGTTAACTTGTTAAGAACTTCAGTAGGCAGTAAACACATTTGAGGGGATGTCCGCT
-180          HAP(5)          -130
ATCTTCGGAACTTCATTTTATTGGATGGAGATTGATTGAAATAGAAAAGTTGAATCATC
TAGAAGCCCTTGAAGTAAATTACCTACCTCTAAACTAACTTTATCTTCCAACTTAGTAG
PDS(5)          -70
AAGGGCTACAATCAGAGATTGCAGCATGGTTGAAAAATTTAAGTACGTAGCTTATGACTC
TTCCCGATGTTAGTCTCTAACGCTGTACCAACTTTTAAAAATTCATGCATGCAATAGTGA
GATA(4) TATA          -10
CGGGTATAATTATATAAAAACTGGTGGGAATCAGCAAGAACTTGACATGTAGATTTTCT
GCCCTATTATATATTTATGACCACCCCTTAGTGGTTCTTTGAACTGTACATCTAAAAAGA
+1          +30
AATATATCGTCTATCTCGGCATATTATAACAACAATCAACAAATGGTCTTACCTCAGGA
TTTCATAGCAGATAGAGCCGTATAATATTGTGTAGTTGTTTTACCAGAAATGGAGTCT
5' DGDH1 mRNA          M Y L P H E
DGDH1
HindIII
ACCAGAATTTCAACAAGCTT
TGGTCTTAAAGTTGTTCGAA

```

**Figura 8. Secuencia y elementos en cis del promotor *DhGDH1*.** Elementos con función probable en *D. hansenii*. Se muestran, resaltados y numerados a partir del extremo 5' de la secuencia, los sitios putativos de unión a Gln3, Gat1 y Dal80 (GATA), Gcn4 (*GCN4*), el complejo HAP (HAP), Msn2p, Msn4p (STRE) y PDS. Se resalta la caja putativa TATA y el sitio de inicio de la transcripción en la posición +1. Se utilizaron los sitios de restricción *EcoR1* y *HindIII* para clonar el promotor en el plásmido YEp353 (2 $\mu$  *URA3 lacZ*), generando el plásmido pDhGDH1- 2.





**Figura 9. Expresión del gen *DhGDH1*, en mutantes afectadas en factores transcripcionales del metabolismo del carbono y del nitrógeno.** Se obtuvieron extractos de las diferentes cepas crecidas en medio mínimo suplementado con diferentes fuentes de nitrógeno, prolina (barras blancas), sulfato de amonio (barras grises), asparagina (barras negras) y como fuente de carbono glucosa. Las levaduras se cosecharon durante la fase exponencial de crecimiento. Los promedios de las actividades de  $\beta$ -galactosidasa reportadas son comparados con prolina, donde se encuentra la mayor actividad. Resultados obtenidos de tres experimentos independientes.

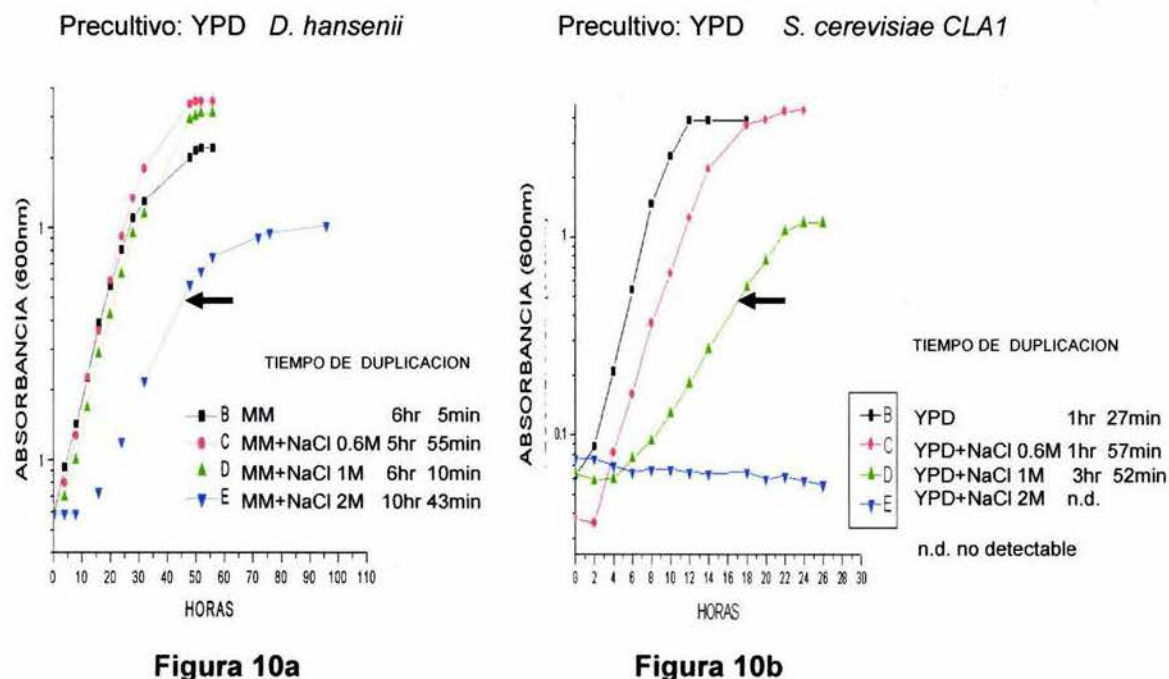
### 3. Expresión transcripcional del gen *DhGDH1* en la levadura halotolerante *D. hansenii* y en la cepa complementada de *S. cerevisiae*.

#### 3a. Condiciones de cultivo de la levadura halotolerante *Debaryomyces hansenii*.

Para establecer las condiciones de cultivo de *D. hansenii*, la levadura marina se creció en medio mínimo (MM-NH<sub>4</sub>) con concentraciones crecientes de sal (NaCl), se curva de crecimiento mostró que *D. hansenii* tiene el mismo tiempo de duplicación sin sal, que en presencia de 0.6M y 1M de NaCl (**Figura 10a**). En contraste el tiempo de duplicación de *S. cerevisiae* es mayor en presencia de sal dado que *S. cerevisiae* presenta una tolerancia sensibilidad moderada a la sal (Hohmann S. 2002) (**Figura 10a y 10d**). El tiempo de duplicación de *D. hansenii* en 2 M de NaCl es mayor que en ausencia de sal, mientras que *S. cerevisiae* es incapaz de crecer en esta condición (**Figura 10a y 10b**). *D. hansenii* mostró un tiempo de duplicación de seis horas para las condiciones sin sal, 0.6M y 1M de NaCl, mientras en 2M de NaCl es tiempo de duplicación es de diez horas (**Figura 10a**). Estos datos muestran que *D. hansenii* es un microorganismo halotolerante, capaz de crecer hasta 1M de NaCl sin representar un estrés, además puede crecer en presencia de altas concentraciones de sal, como 2M de NaCl. Esta levadura representa un organismo interesante como modelo biológico alternativo, para estudiar cuales son los mecanismos involucrados en la osmoregulación y homeostasis iónica.

González y colaboradores en el 2004 observaron que *D. hansenii* acumula más Na<sup>+</sup> al cultivarse en 0.6 M de NaCl, lo que sugirió *D. hansenii* puede acumular

sodio sin tener un efecto toxico. Además *D. hansenii* fue capaz de crecer tanto en presencia de NaCl como de KCl. Por lo tanto *D. hansenii* es capaz de crecer en presencia de Na<sup>+</sup>, sin ver afectado su crecimiento (Gonzalez *et al.*, 2004).



**Figura 10. Curvas de crecimiento de *D. hansenii* y *S. cerevisiae*, cultivadas en medio mínimo con concentraciones crecientes de NaCl. Figura 10a.** El precultivo de *D. hansenii*, utilizado fue medio rico YPD. Las células se crecieron en medio mínimo (NH<sub>4</sub>-0.75%) con concentraciones crecientes de NaCl (0.6M, 1M y 2 M), con un inoculó inicial de entre 0.04 y 0.05 de DO. **Figura 10b.** Se utilizó medio rico YPD para el precultivo de *S. cerevisiae*. Las células se crecieron en medio rico YPD con concentraciones crecientes de NaCl (0.6M, 1M y 2 M), con un inoculó inicial de entre 0.04 y 0.05 de DO. Las células de la Figura 10a y 10 b se crecieron hasta alcanzar una DO. de 0.5 para la obtención de RNA total (señalado con una flecha en la curva). Las lecturas se tomaron cada 2 horas para cada una de las curvas de crecimiento.



### 3b. Expresión transcripcional del gen *DhGDH1*.

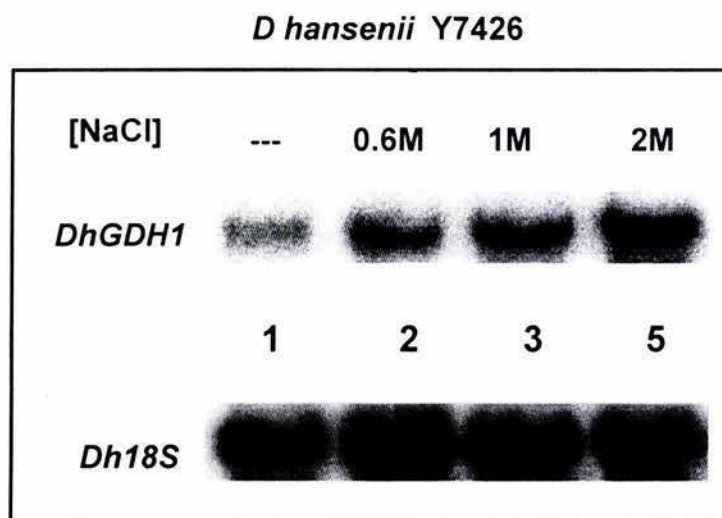
Para el ensayo tipo Northern blot se utilizaron muestras de RNA total obtenidos de diferentes cultivos con concentraciones crecientes de NaCl (0.6M NaCl, 1M NaCl y 2M NaCl). El resultado del ensayo tipo Northern blot mostró un incremento de cuatro veces en la expresión del gen *DhGDH1* en presencia de 2M de NaCl. Lo que evidencio que la expresión del gen *DhGDH1* es dependiente de la presencia de sal (NaCl) en las condiciones analizadas (**Figura 11**). Estos datos sugieren que el incremento en la actividad enzimática NADP glutamato deshidrogenas podría deberse al aumento en la expresión del gen *DhGDH1*.

Aunque *D. hansenii* ha constituido un interesante modelo para estudiar la osmotolerancia, solo tres genes han sido involucrados en respuesta a altas concentraciones de sal, *DhENA1*, *DhENA2* y *DhGPD1*. Los genes homólogos en *S. cerevisiae* son parte importante en la respuesta a estrés osmótico (Thôme P.E., *et al.*, 1999; Hohmann S. 2002; Thôme P.E. 2004; Almagro A., *et al.*, 2004).

Tomando en cuenta estos resultados podemos concluir que, por primera vez en *D. hansenii*, se determinó que el gen *DhGDH1* participa en la síntesis de glutamato e incrementa su expresión como respuesta a un estímulo constante de NaCl.

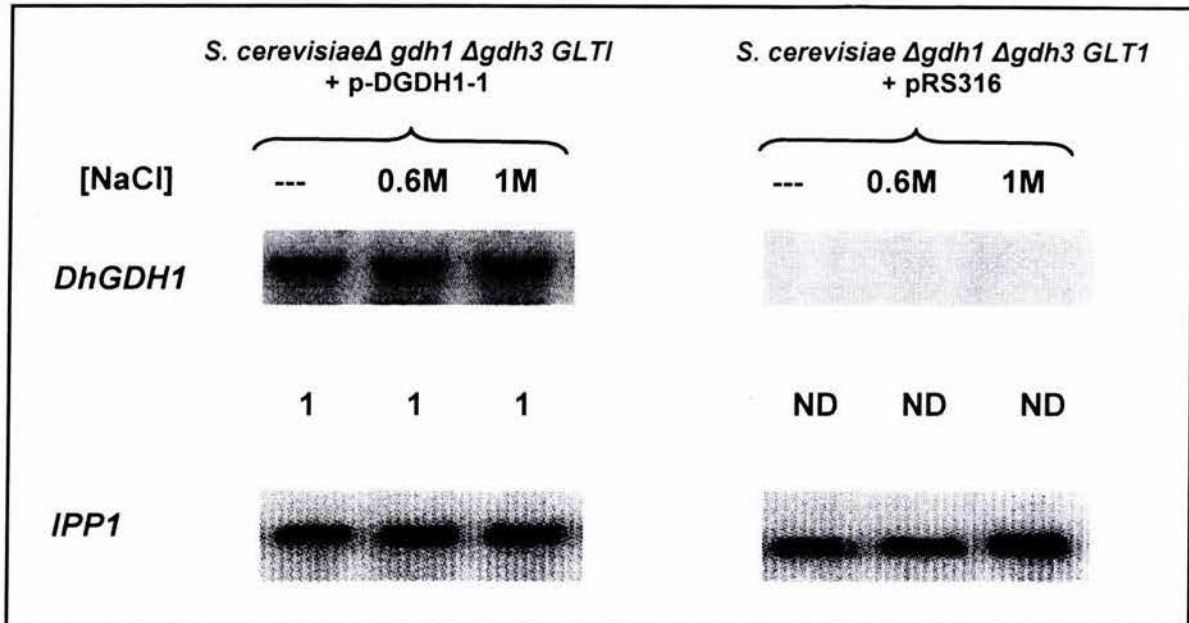
Para determinar si el gen *DhGDH1* en la cepa transformada de *S. cerevisiae* con el gen *DhGDH1* de *D. hansenii* respondía a un estímulo constante de sal igual al observado en *D. hansenii* se llevó a cabo un ensayo tipo Northern blot (**Figura 12**) en donde se observó que a concentraciones crecientes de NaCl, la expresión del gen *DhGDH1* no cambia, lo que sugiere que hay una expresión constitutiva del gen *DhGDH1* (**Figura 12**). Este resultado se corrobora cuando la

expresión del reportero  $\beta$  galactosidas del plásmido pDhGDH1-2, no mostró cambios en su actividad en crecidos con sal ó sin sal (datos no mostrados). Estos resultados nos indican que la regulación transcripcional del gen *DhGDH1* en *S. cerevisiae* no responde a la presencia de sal (**Figura 12**). En base a estos resultados nosotros proponemos que *S. cerevisiae* no posee el factor o factores de transcripción necesarios para regular la expresión del gen *DhGDH1*, como se observa en *D. hansenii*. Otra posibilidad es que la secuencia a la que nosotros hemos llamado promotor no este completa y por tal motivo no muestra una expresión como la observada en *D. hansenii*.



**Figura 11. Expresión del gen *DhGDH1* en *D. hansenii* utilizando concentraciones crecientes de NaCl.** Se inocularon a DO. entre 0.04 y 0.05 en los medios MM, MM+NaCl 0.6M, MM+NaCl 1M y MM+NaCl 2M. Las células se crecieron hasta alcanzar una DO. de 0.6 para la obtención de RNA total. Todos los carriles se normalizaron mediante densitometría usando como control de cargado RNA ribosomal 18S. Para determinar la expresión del gen *DhGDH1*, se compararon las densitometrías de los RNAm obtenidos de cada uno de los medios con NaCl, con el RNAm obtenido del medio sin sal dándole un valor numérico de uno a esta última condición.

CLA14-pDhGDH1-1



**Figura 12.** Expresión del gen *DhGDH1* en la cepa de *S. cerevisiae* transformada con el vector pDhGDH1-1 utilizando concentraciones crecientes de NaCl. Las cepas utilizadas se inocularon a DO. entre 0.04 y 0.05 en los medios MM, MM+NaCl 0.6M y MM+NaCl 1M. Las células se crecieron hasta alcanzar una DO. de 0.6 para la obtención de RNA total. Todos los carriles se normalizaron mediante densitometría usando como control de cargado RNAm *IPP1*. Para determinar la expresión del gen *DhGDH1*, se compararon las densitometrías de los RNAm obtenidos de cada uno de los medios con NaCl, con el RNAm obtenido del medio sin sal dándole un valor numérico de uno a esta última condición. ND. No Detectable.



#### 4. Aislar el gen *DhGLN1* de *D. hansenii*.

Existen dos tipos de enzimas que participan en la asimilación de amonio estas son la NADP glutamato deshidrogenasa (NADP-GDH) y la glutamino sintetasa (GS), de estas enzimas ya estudiamos la NADP-GDH de *D. hansenii*, por lo que nos interesa clonar el gen que codifica para la glutamina sintetasa, *DhGLN1*, para estudiar la respuesta transcripcional al cultivarse a *D. hansenii* en diferentes concentraciones de sal.

Una vez que habíamos establecido que la enzima DhGDH1p de *D. hansenii* participa en la asimilación de amonio y considerando que en *S. cerevisiae* tanto la enzima NADP- glutamato deshidrogenasa como la glutamato sintetasa están involucradas en este proceso. Decidimos averiguar si además de la enzima DhGDH1p de *D. hansenii* también la GS participaba en el metabolismo de la asimilación de amonio. Por lo que inicialmente procedimos a aislar el gen que codifica por la glutamato sintetasa en *D. hansenii*.

Para obtener el gen *DhGLN1* de *D. hansenii* se transformó a la cepa de *S. cerevisiae* CN1 que carecía del gen *GLN1* (*gln1Δ*) con el banco genómico de la levadura marina *D. hansenii* construida en el vector YEp 352. La cepa CN1 es auxotrofa total de glutamina, por lo que las cepas CN1 complementadas con el gen *DhGLN1*, deberían de ser capaces de crecer sin glutamina. De esta manera se identificaron 20 cepas, a partir de las cuales se obtuvieron los plásmidos y estos se sometieron a digestión enzimática para obtener el inserto presente en los plásmidos. En todos los casos se observó que los plásmidos tenían el mismo patrón de restricción, por lo tanto todas las cepas contenían el mismo inserto de 4800 pb. Por esta razón decidimos trabajar con el plásmido pDhGLN1-1, este se

secuencia y se determinó en base a su secuencia y alineamiento con el gen *GLN1* de *S. cerevisiae* que el fragmento subclonado sí era el gen *DhGLN1* de *D. hansenii*. Los resultados mostraron que la cepa CN1 fue capaz de expresar el gen *DhGLN1* de *D. hansenii* y recuperar el crecimiento silvestre en ausencia de glutamina. Un alineamiento de esta secuencia con la del gen *GLN1* de *S. cerevisiae* nos permitió proponer que de los 4800 pb, 1740 pb correspondían al gen *DhGLN1* de *D. hansenii*. Un análisis más detallado de estas 1740 pb con respecto a la secuencia de *GLN1* de *S. cerevisiae* nos permitió establecer que 523 pb correspondían a la región reguladora y 1217 pb constituían al marco abierto de lectura (ORF) de *DhGLN1* de *D. hansenii*.

Considerando que la cepa CN1 que carece del gen *GLN1*, había sido capaz de crecer en ausencia de glutamina, esto nos indicaba que el gen *DhGLN1* de *D. hansenii* había sido capaz de complementar la falta del gen *GLN1* de *S. cerevisiae*. Este resultado mostraba que el gen *DhGLN1* de *D. hansenii* si se está expresando en un sistema heterólogo como lo es *S. cerevisiae*.

## **5. Expresión transcripcional del gen *DhGLN1* en la levadura halotolerante *D. hansenii* y en la cepa complementada de *S. cerevisiae*.**

Nosotros sabemos que el gen *DhGDH1* es capaz de modificar su expresión en base a estímulos por sal (NaCl). Con el propósito de averiguar si el gen *DhGLN1* también modificaba su expresión en concentraciones crecientes de sal se realizaron ensayos Northern blot. Para esto la cepa silvestre de *D. hansenii* se creció en medio mínimo con cantidades crecientes de sal que son 0.6 M, 1 M y 2 M, hasta que alcanzaron la D.O. de 0.5-0.6 (crecimiento logarítmico) y de estos

cultivos se obtuvo el RNA total que se empleo para hacer el ensayo de Northern blot. Los resultados de este ensayo se muestran en la **figura 13** en donde se aprecia una disminución de la expresión del gen *DhGLN1* es dependiente de la presencia de sal, en donde en el caso del cultivo que fue crecido con 2 M de sal se aprecia una disminución de hasta cuatro veces respecto a la condicion sin sal.

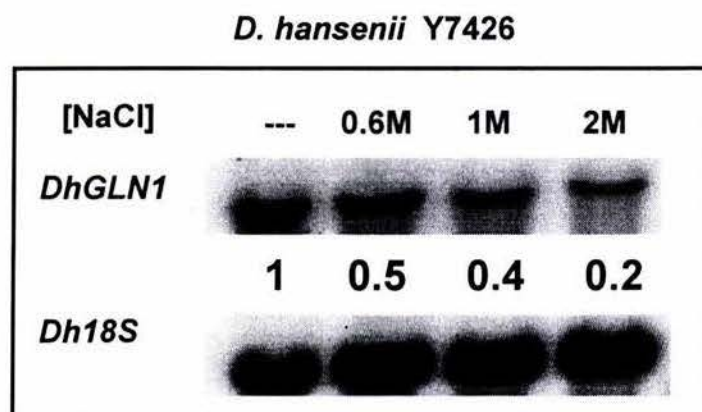
Una vez que habíamos encontrado que la expresión del gen *DhGLN1* en *D. hansenii* disminuía de manera dependiente de la presencia de sal. Ahora quisimos averiguar si el decrecimiento en los niveles de expresión del RNA mensajero de este gen también decrecía conforme se incrementada la concentración de sal, cuando este se estudiaba en la cepa de *S. cerevisiae* CN1.pDhGLN1-1. Es decir si la regulación de este gen en *S. cerevisiae* es similar a lo que encontramos en *D. hansenii*.

Para determinar si el gen *DhGLN1* en la cepa transformada de *S. cerevisiae* responde a un estímulo constante de sal igual a lo que observamos en *D. hansenii* se llevó a cabo un ensayo tipo Northern blot (**Figura 14**). En este ensayo se encontró que a diferencia de lo que observamos en *D. hansenii* la expresión del gen *DhGLN1* no cambia. Estos resultados nos muestran que la regulación transcripcional del gen *DhGLN1* en *S. cerevisiae* no responde a la presencia de sal (**Figura 14**). Esto podría deberse a la falta de algún factor regulatorio de la expresión, que no esta presente en *S. cerevisiae*, por lo que no muestra un decremento en la expresión del gen *DhGLN1*, como el observado en *D. hansenii*. Otra posibilidad es que la secuencia a la que nosotros hemos llamado promotor no este completa y por tal motivo no muestra una expresión como la observada en *D. hansenii*.



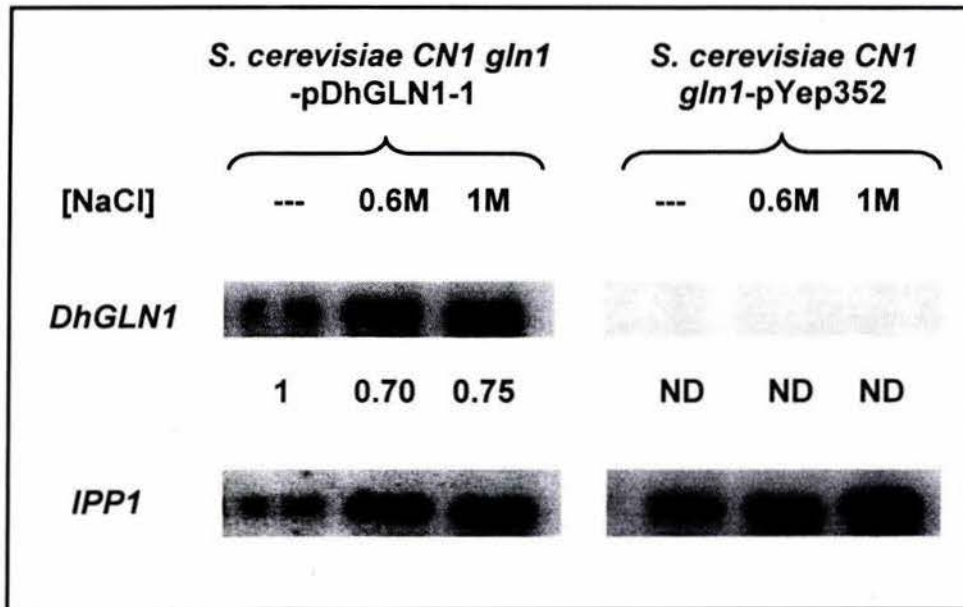
En este trabajo por primera vez se ha demostrado que la sal en *D. hansenii* regula la expresión de los genes involucrados en la asimilación de amonio, *DhGDH1* y *DhGLN1*. La expresión de genes involucrados en el metabolismo central de nitrógeno no había sido relacionada en la respuesta al estrés osmótico. Esto contrasta con lo reportado en *S. cerevisiae* en donde los genes *GDH1* y *GLN1* no responden a estrés osmótico. Por lo que esto es una característica exclusiva de *D. hansenii*.

Por lo que estos resultados nos permiten sugerir que la respuesta dependiente de la presencia de sal presente en *D. hansenii*, con la cual modifica la expresión transcripcional de los genes *DhGDH1* y *DhGLN1*, no esta presente en *S. cerevisiae*.



**Figura 13. Expresión del gen *DhGLN1* en *D. hansenii* utilizando concentraciones crecientes de NaCl.** Se utilizaron las mismas condiciones de crecimiento y obtención del RNA total, como en la figura 10. Los carriles se normalizaron mediante densitometría usando como control de cargado RNA ribosomal 18S. Para determinar la expresión del gen *DhGLN1*, se compararon las densitometrías de los RNAm obtenidos en cada uno de los medios con NaCl, con el RNAm obtenido del medio sin sal dándole un valor numérico de uno a esta última condición.

CN1- pDhGLN1-1



**Figura 14. Expresión del gen *DhGLN1* en la cepa de *S. cerevisiae* transformada con el vector pDhGLN1-1 utilizando concentraciones crecientes de NaCl.** Las cepas se inocularon a DO. entre 0.04 y 0.05 en los medios MM, MM+NaCl 0.6M y MM+NaCl 1M. Las células se crecieron hasta alcanzar una DO. de 0.6 para la obtención de RNA total. Todos los carriles se normalizaron mediante densitometría usando como control de cargado RNAm *IPP1*. Para determinar la expresión del gen *DhGLN1*, se compararon las densitometrías de los RNAm obtenidos de cada uno de los medios con concentraciones crecientes de NaCl con el RNAm obtenido de medio sin sal dándole un valor numérico de uno a esta última condición. ND. No Detectable.

## 7. Efecto de la sal sobre la expresión de los genes *GDH1* y *GLN1* de *S. cerevisiae* cepa silvestre.

La levadura *S. cerevisiae* ha sido utilizada para estudiar la respuesta a estrés osmótico, esta levadura se ha cultivado en presencia de sal por unos minutos o una hora, lo cual representa un estrés osmótico para *S. cerevisiae* (Rep M., *et al.*, 1999; Hohmann S., 2002). Por lo que nosotros queríamos averiguar que tanto se afectaba la expresión transcripcional de los genes *GDH1*, *GLN1* y *GPD1* de *S. cerevisiae*, al crecerse con un estímulo constante de cloruro de sodio hasta llegar a la fase de crecimiento logaritmico (**Figura 10 b**). Se cultivo a *S. cerevisiae* en presencia de diferentes concentraciones crecientes de NaCl (0.6M NaCl, 1M NaCl y 2M NaCl) y de estas condiciones se obtuvo el RNA total.

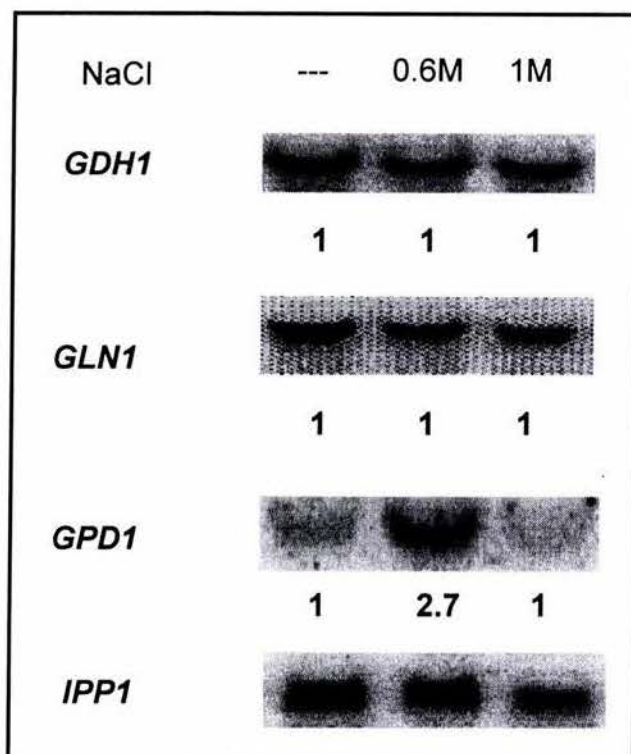
Para determinar la expresión de los genes *GDH1* y *GLN1* de *S. cerevisiae* en condiciones de estrés osmótico continuo, se realizó un ensayo tipo Northern (**Figura 15**). Los resultados mostraron que a concentraciones crecientes de sal (0.6M y 1M NaCl) la expresión de los genes *GDH1* y *GLN1* no cambia. Se encontro que la expresión del gen *GPD1* aumento 1.7 veces al cultivarse durante 10 horas en presencia de 0.6M de NaCl. Este dato es novedoso ya que hasta ahora se habia estudiado la expresión del gen *GPD1* en choque osmótico y no en condiciones en donde la presencia de NaCl fuera continua. En condiciones de choque osmótico el gen *GPD1* aumenta 20 veces los promeros 15 - 30 minutos después del chock osmótico. Nosotros estamos observando que en un cultivo con concentración constante de NaCl, el gen *GPD1* aumento 1.7 veces, lo que sugiere que la población de las células crecidas durante 10 horas en 0.6M de NaCl, incrementa su expresión 1.7 veces con respecto al control en ausencia de sal.



Nuevamente cuando nuestro cultivo de *S. cerevisiae* se creció de manera continua en presencia de 1 M de NaCl no se observa un incremento en la expresión del gen *GPD1* similar a lo que encontramos cuando se cultiva en ausencia de sal, lo que pudiera indicar que a esta concentración de sal, cuando el cultivo se encuentra en la fase logarítmica (aproximadamente 20 horas de cultivo), nuevamente nuestro gen llegó a su estado basal. Lo que nos estaría sugiriendo que a mayor estrés osmótico la expresión del gen *GPD1* se retarda o bien que su máximo estado de expresión ya pasó (Rep M., *et al.*, 1999; Rep M., *et al.*, 2000).

Tomando en cuenta todos nuestros resultados obtenidos para la cepa silvestre de *S. cerevisiae* podemos concluir que la expresión de los genes *GDH1* y *GLN1* no responden a la presencia de sal, lo cual contrasta con lo observado en *D. hansenii* en donde la expresión de los genes *DhGDH1* y *DhGLN1* se modifica en presencia de sal (**Figura 11,13 y 15**). Lo que nos permite concluir que la expresión de los genes *DhGDH1* y *DhGLN1* de *S. cerevisiae* no son necesarios para la respuesta a estrés osmótico continuo.

***S. cerevisiae* CLA1**



**Figura 15. Expresión del gen *GDH1* y *GLN1* en *S. cerevisiae* utilizando concentraciones crecientes de NaCl.** La cepa se inoculó a DO. entre 0.04 y 0.05 en los medios MM, MM+NaCl 0.6M, MM+NaCl 1M. Las células se crecieron hasta alcanzar una DO. de 0.5-0.6, para la obtención de RNA total. Todos los carriles se normalizaron mediante densitometría usando como control de cargado el RNAm del gen *IPP1*. Para determinar la expresión del gen *GDH1*, *GLN1* y *GPD1* se compararon las densitometrías de los RNAm obtenidos de cada uno de los medios con NaCl, con el RNAm obtenido del medio sin sal dándole un valor numérico de uno a esta última condición.

## 8. Localización cromosómica de los genes *DhGDH1* y *DhGLN1*.

Para localizar en que cromosomas se encuentran los genes *DhGDH1* y *DhGLN1*, *DhVMA13* y *Dh18S*, se decidió montar la técnica de electroforesis de cromosomas de campos pulsados (PFGE) para separar los cromosomas de *D. hansenii*. El consorcio **Genolevures** ha reportado la presencia de siete cromosomas en *D. hansenii* (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/>; Corredor M., *et al.*, 2003; Petersen KM y Jespersen L., 2004).

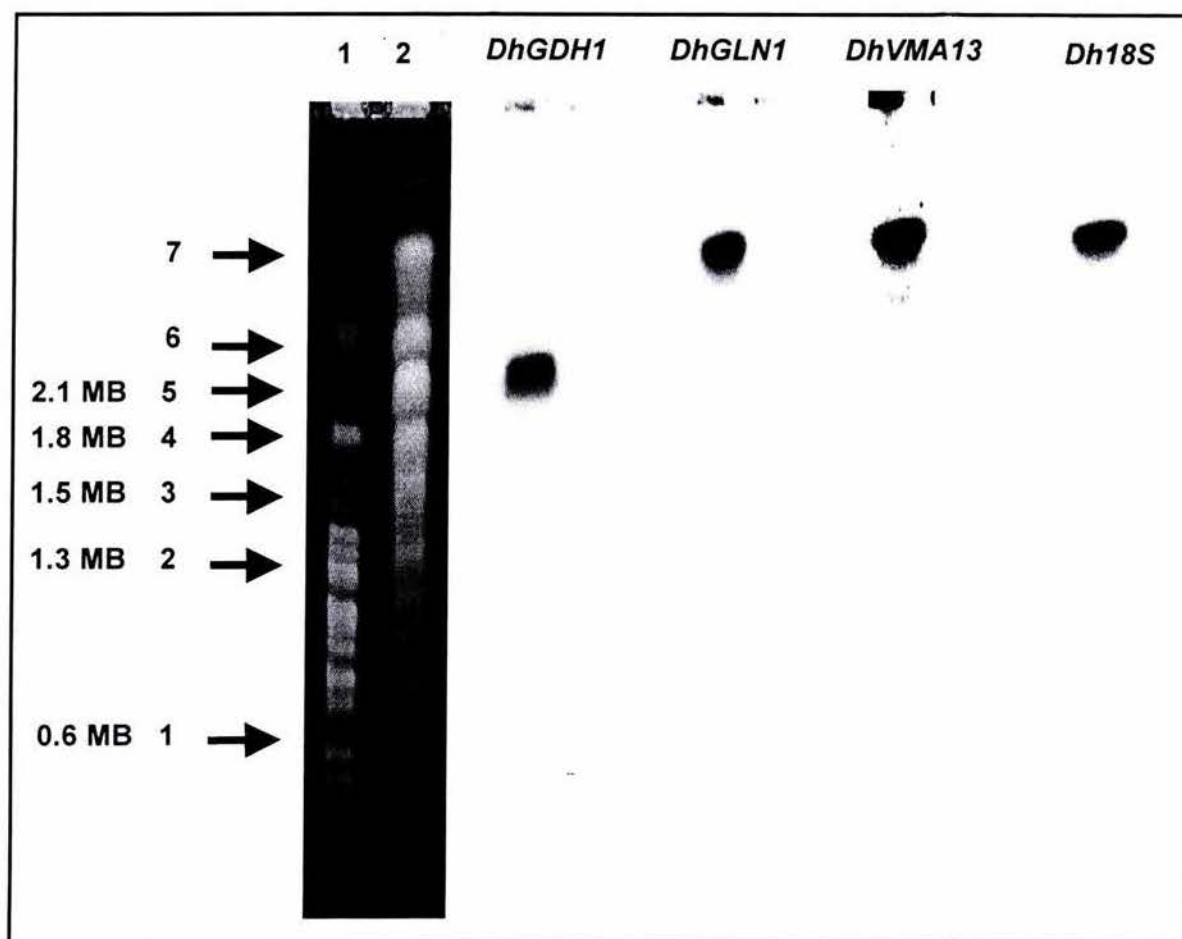
Como se aprecia en la **figura 16** nosotros también fuimos capaces de separar los siete cromosomas que *D. hansenii* posee. Usando a *S. cerevisiae* como marcados de peso molecular se pudo determinar el peso molecular de algunos de los cromosomas de *D. hansenii* (**Figura 16**). Estos cromosomas se transfirieron a una membrana de Nylon y se hibridaron con las sondas que correspondían a los genes *DhGDH1*, *DhGLN1*, *DhVMA13* y *Dh18S*. El resultado de cada uno de las hibridaciones se muestra en la figura 15 en donde el gen *DhGDH1* se localizó en el cromosoma cinco; mientras que los genes *DhGLN1*, *DhVMA13* y *Dh18S* se localizan en el cromosoma siete. Esto correlaciona con lo reportado por Genolevures que ubica a los genes *DhGLN1* y *DhVMA13* en el cromosoma G, que corresponde al cromosoma siete. En cuanto a si el gen ribosomal se ubica también en el cromosoma siete, no podemos establecer ninguna comparación con lo ya reportado con el consorcio Genolevures, ya que hasta la fecha la secuencia para este gen no ha sido liberada.

En el 2003 Corredor y colaboradores determinaron que el gen *ACT1-like* se encuentra en el cromosoma tres; en el cromosoma cinco se localizan *LAC4-like* y *GPD1-like* en el cromosoma cuatro. Sin embargo, vale la pena mencionar que



Corredor y colaboradores, bajo sus condiciones de separación de cromosomas solo permiten evidenciar seis cromosomas (Corredor M., *et al.*, 2003).

En base a nuestros resultados los cuales corroboran muy bien con el consorcio Genolevures, podemos concluir que *D. hansenii* tiene siete cromosomas, y en estos se pudo determinar la localización de los genes *DhGDH1*, *DhGLN1*, *DhVMA13* y *Dh18S*.



**Figura 16. Electroforésis de cromosomas en campos pulsados.** Para la preparación de cromosomas de *D. hansenii* Y7426 y *S. cerevisiae* CLA1, se cultivaron 50 ml de YPD, durante toda la noche. Cada una de las sondas utilizadas se describe en el artículo, y en el apéndice el protocolo para la obtención de cromosomas. 1. *S. cerevisiae*, 2. *D. hansenii* Y7426.

## V. CONCLUSIONES

1. El gen *DhGDH1* complementa la función enzimática NADP-GDH1 en la cepa de *S. cerevisiae gdh1Δ gdh3Δ GLT1*. El gen *DhGDH1* complementa el fenotipo de crecimiento, la actividad enzimática, tanto en presencia como en ausencia de sal (NaCl).
2. La expresión de *DhGDH1* de *D. hansenii* es regulada por la presencia de NaCl; mientras que en la cepa complementada con este gen en *S. cerevisiae Δgdh1 Δgdh3 GLT1*, esta no responde a la presencia de NaCl, por lo que la expresión del gen *DhGDH1* en la cepa *S. cerevisiae gdh1Δ gdh3Δ GLT1* se vuelve constitutiva.
3. La expresión basal de *DhGDH1* en *S. cerevisiae* depende de los factores de transcripción Gln3, Hap2p y Hap3p.
4. El gen de *D. hansenii* (*DhGLN1*) complementa la falta de la enzima glutamino sintetasa de *S. cerevisiae gln1Δ*.
5. La expresión de *DhGLN1* disminuye en presencia de NaCl en *D. hansenii*, mientras que en la cepa complementada de *S. cerevisiae gln1Δ*, no cambia su expresión.
6. La expresión dependiente de sal de *DhGDH1* y *DhGLN1* involucra una respuesta que es exclusiva a *D. hansenii* y no están presentes en *S. cerevisiae*.

7. La regulación dependiente de sal de genes involucrados en vías metabólicas centrales podría formar parte de una estrategia que conduce a la habilidad para crecer bajo condiciones hipersalinas en la levadura *D. hansenii*.

8. *S. cerevisiae* no es un buen modelo para estudiar la regulación transcripcional de los genes de *D. hansenii*.



## VI. PERSPECTIVAS

- ▣ Determinar si la expresión sal-dependiente de *DhGDH1* y *DhGLN1* es debido a un efecto osmótico o iónico.
  
- ▣ Determinar si la expresión de *DhGDH1* cambia en presencia de otras sales tales como KCl, LiCl, NH<sub>4</sub>Cl, que generen un estrés osmótico.
  
- ▣ Determinar si la expresión de *DhGDH1* y *DhGLN1* cambia en cultivos con pH alcalino.
  
- ▣ Mutar el gen *DhGDH1*, y determinar si es importante para la respuesta a estrés osmótico.
  
- ▣ Construir un vector para transformar a *D. hansenii*, que nos permita estudiar la regulación transcripcional de *DhGDH1* y *DhGLN1* en el mismo organismo.

## VII. REFERENCIAS

- Adler L., and Gustafsson L. (1980) Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiol* **124**:123-130.
- Adler L., Blomberg A., and Nilsson A. (1985) Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Bacteriol* **162**: 300-306
- Alba-Lois L., Segal C., Rodarte B., Valdés L. V., DeLuna A., and Cárdenas R. (2004) NADP-glucamate dehydrogenase activity is increased under hyperosmotic conditions in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Curr Microbiol.* **48**: 68-72.
- Alepuz P.M., Javanovic A., Reiser V., and Ammerer G. (2001) Stress-induced MAP kinase Hog1 is part of transcription activation complex. *Mol. Cell.* **7**:667-777.
- Almagro A., Prista C., Castro S., Quintas C., Madeira-Lopes A., Ramos J., and Loureiro-Dias M.C. (2000) Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *Int. J. of Food Microbiol.* **56**: 191-197
- Almagro A., Prista C., Benito B., Loureiro-Dias M.C., and Ramos, J. (2001) Cloning and Expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Bacteriol.* **183**: 3251-3255.
- André L., Nilsson A., and Adler L. (1988) The role of glycerol in osmotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 669-677.
- Avendaño A., DeLuna A., Olivera H., Valenzuela L., and Gonzalez A. (1997) *J. Bacteriol.* **179**: 5594-5597.
- Bansal P.K., and Mondal A.K. (2000) Isolation and sequence of the HOG homologue from *Debaryomyces hansenii* by complementation of the *Hog1Δ* strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**: 81-88.
- Bansal P.K., Sharma P., and Mondal A.K. (2001a) A *PBS2* homologue from *Debaryomyces hansenii* shows a differential effect on calcofluor and polymyxin B sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **18**: 1207-1216.
- Bansal P.K., Sharma P., and Mondal A.K. (2001b) A minisatellite sequence in the upstream region of the *DURA3* gene from the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **18**: 1301-1307.
- Banuet F. (1998) Signalling in the yeast: An informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:249-272.

Beck T., and Hall M. N. (1999) The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature*. **402**:689-692.

Bell M., R Capone., I Pashtan., Levitzki A., and Engelberg D. (2001) Isolation of hyperactive mutants of the MAPK p38/Hog1 those are independent of MAPK Kinase activation. *J. Biol. Chem.* **276**:25351-25358.

Bell M., and Engelberg D. (2003) Phosphorylation of Tyr-176 of the yeast MAPK Hog1/p38 is not vital for Hog 1 biological activity. *J. Biol. Chem.* **278**:14603-14606.

Blomberg A., and Adler L. (1992) Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* **33**:145-212.

Brewster J. L., de Valoir T., Dwyer N. D., Winter E., and Gustin M. C. (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**:1760-1763.

Brown A. D., and Simpson J. R. (1972) Water relation of sugar-tolerant yeast: the role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.* **72**: 589-591.

Bysani N., Daugherty J. R., and Cooper T. G. (1991) Saturation mutagenesis of *USA<sub>NTR</sub>* (GATAA) responsible for nitrogen catabolite repression-sensitive transcriptional activation of the allantoin pathway genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **173**: 7186-7195.

Cardenas M. E., Cutler N. S., Lorenz M. C., Como C. J. D., and Heitman J. (1999) The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Gene and Dev.* **13**:3271-3279.

Coffman J. A., Rai R., Cunningham T., Svetlov V., and Cooper T. G. (1996) Gat1, a GATA family protein whose production is sensitive to nitrogen catabolite repression, participates in transcriptional activation of nitrogen-catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cel. Biol.* **16**:847-858.

Conway E. J., and Downey M. (1950) An outer metabolic region of the yeast cell. *Biochem.J.* **47**:347-355.

Coury L.A., McGeoch J. E. M., Guidotti G., and Brodsky J. L. (1999) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* does not sequester chloride but can express a functional mammalian chloride channel. *FEMS Microbiol. Letters.* **179**: 327-332.

Cooper T. G. (2002) Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 223-238.

Courchesne W. E., and Magasanik B. (1988) Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of the URE2 and GLN3 genes. *J. Bacteriol.* **170**:708-713.



Cunningham T. S., and Cooper T. G. (1993) The *Saccharomyces cerevisiae* DAL80 repressor protein binds to multiple copies of GATAA-containing sequences (URS<sub>GATA</sub>). *J. Bacteriol.* **175**:5851-5861.

Cunningham T. S., Dorrington R. A., and Cooper T. G. (1994) The *UGA4* UAS<sub>NTR</sub> site for Gln-dependent transcriptional activation also mediates Dal80-responsive regulation and Dal80 protein binding in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **176**:4718-4725.

Crespo J. L., Daicho K., Ushimaru T., and Hall M. N. (2001) The GATA transcription factors Gln3 and Gat1 link TOR to salt stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Biochem.* **276**:34441-34444.

de Nadal E., Casadomé L., and Posas F. (2003) Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cel. Biol.* **23**:229-237.

Dichtl B., Stevens A., and Tollervey D. (1997) Lithium toxicity in yeast is due to inhibitor of RNA processing enzymes. *EMBO J.* **16**:7184-7195.

Garay-Arroyo A., and Covarrubias A. (1999) Three genes whose expression is induced by stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **15**:879-892.

Garciadeblas B., Rubio F., Quintero F. J., Bañuelos M. A., Haro R., and Rodríguez-Navarro A. (1993) Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **236**:363-368.

Gaxiola R., deLarrinoa F., Villalba J. M., and Serrano R. (1992) A novel and conserved sal-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J.* **11**:3157-3164

Goossens A., Dever T. E., Pascual-Ahuir A., and Serrano R. (2001) The protein kinase Gcn2p mediates sodium toxicity in yeast. *J. Biol. Chem.* **276**: 30753-30760.

González H. J.C., Cardenas M. C. A., and Peña A. (2004) Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast.* **21**: 403-412.

Gläser H., Thomas U. D., Gaxiola R., Montrichard F., Surdin-Kerjan Y., and Serrano R. (1993) Salt tolerance and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* involved a putative phosphatase gene. *EMBO J.* **12**:3105-3110.

Gustafsson L., and Norkrans B. (1976) On the mechanism of salt tolerance. *Arch. Microbiol.* **110**:177-183

Gustafsson L. (1979) The ATP pool relation to the production of glycerol and heat during growth of the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiol.* **120**: 15-23.

Gustin M.C., Albertyn J., Alexander M., and Davenport K. (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol.* **62**: 1264-1300.

Heitman J., Movva N. R., and Hall M. N. (1991a) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science.* **253**:905-909.

Heitman J., Movva N.R., Hiestand P. C., and Hall M. N. (1991b) FK 506-binding protein prolin rotamase is a target for the immunosuppressive agent FK 506 in *Saccharomyces cerevisiae*. *P. N. A. S.* **88**:1948-1952.

Hernández S. N.Y., Egly J. M., and Ochoa J.L. (1998) Cloning and sequencing of a cDNA encoding a copper-zinc superoxide dismutase enzyme from the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **14**: 573-581.

Hirayama T., Maeda T., Saito H., and Shinozaki K. (1995) Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **249**:127-138.

Hinnebusch A.G. (1993) Gene-specific translational control of the yeast GCN4 gene by phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2. *Mol. Microbiol.* **10**: 215-223.

Hohmann S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in Yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:300-372.

Hobot J.A., and Jennings D. H. (1981) Growth of *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to pH and salinity. *Exp Mycol* **5**: 217-228

Jacoby T., Flanagan H., Faykin A., Seto A. G., Mattinson C., and Ota I. (1997) Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1. *J. Biol. Chem.* **272**:17749-17755.

Jovall P-A., Tunblad-Johansson I., and Adler L. (1990) <sup>13</sup>C NMR analysis of production and accumulation of osmoregulatory metabolites in sal-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiol.* **154**: 209-214

Kültz D., and Burg M. (1998) Evolution of osmotic stress signaling via MAP Kinase cascades. *J. Exp. Biol.* **201**:3015-3021.



Kunz J., Henriquez R., Schneider U., Deuter-Reinhard M., Movva N. R., and Hall M. N. (1993) Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell*. **73**:585-596.

Larsson C., and Gustafsson L. (1987) Glycerol production in relation to the ATP pool and heat production rate of the yeast *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* during salt stress. *Arch Microbiol* **147**: 358-363

Larsson C., Morales C., Gustafsson L., and Adler L. (1990) Osmoregulation of the salt tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *J Bacteriol* **172**: 1769-1774.

Lengeler K.B., Davidson RC., Souza C. D., Harashima T., Shen W. C., Wang P., Pan X., Waugh M., and Heitman J. (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 746-785.

Maeda T., Wurgler-Murphy S. M., and Saito H. (1994) A two-component system that regulates an osmosensin MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**:242-245.

Maeda T., Takekawa M., and Saito H. (1995) Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or binding of an SH3-containing osmosensors. *Science* **269**:554-558.

Magasanik B., and Kaiser C. (2002) Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gen.* **290**: 1-18

Marzluf G. A. (1981) Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. *Microbiol. Rev.* **45**: 437-461.

Marzluf G. A. (1997) Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 17-32

Márquez J. A., and Serrano R. (1996) Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMRA/ENA1* during salt stress in yeast. *FEBS Lett.* **382**: 89-92.

Márquez J. A., Pascual-Ahuir A., Prof M., and Serrano R. (1998) The Ssn6-Tup1 repressor complex of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the osmotic induction of HOG-dependent and independent genes. *EMBO J.* **17**: 2543-2553.

Martínez- Pastor, M.T., Marchler G., Shüller C., Marchler-Bauer A., Ruis H., and Estruch F. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2 and Msn4 are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *EMBO J.* **15**:2227-2235.

Mattinson C. P., and Ota I. M. (2000) Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast. *Genes. Dev.* **14**:1229-1235.



- Mendoza I., Rubio F., Rodríguez-Navarro A., and Pardo J. M. (1994) The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**:8792-8796.
- Milla J.B. (1999) Stress-activated MAP kinase (mitogen-activated protein kinase) pathways of budding and fission yeast. *Biochem. Soc. Symp.* **64**: 49-62.
- Murguia J.R., Bellés J. M, and Serrano R. (1995) A salt-sensitive 3'(2'), 5'-biphosphate nucleotidase involved in sulphate activation. *Science.* **267**:232-234.
- Murguia J.R., Bellés J. M., and Serrano R. (1996) The yeast *HAL2* nucleotidase is *in vivo* target of salt toxicity. *J. Biol. Chem.* **271**:29029-29033.
- Nilsson A., and Adler L. (1990) Purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *B. B. A.* **1034**: 180-185.
- Norkrans B. (1966) Studies on marine occurring yeast: growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Arch. Mikrobiol* **54**: 374-392.
- Norkrans B. (1968) Studies on marine occurring yeast: respiration, fermentation and salt tolerance. *Arch. Microbiol.* **62**: 358-372.
- Norkrans B., and Anders K. (1969) Regulation of the potassium to sodium and of the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeast. *J Bacteriol* **100**: 836-845.
- O'Rourke S.M., and Herskowitz I. (1998) The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **12**:2874-2886.
- O'Rourke S.M., and Herskowitz I. (2002a) A third osmosensing branch in *Saccharomyces cerevisiae* requires the Msb2 protein and functions in parallel with the Sho1 branch. *Mol. Cell. Biol.* **22**:4739-4749.
- O'Rourke S. M., and Herskowitz I. (2002b) Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response. *Trends Gen.* **18**:405-412.
- Ota I. M., and Varshavsky A. (1993) A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science* **262**:566-569.
- Pahlman A-K., Granath K., Ansell R., Hohmann H., and Adler L. (2001) The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2P are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular response to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J.Biol. Chem.* **276**:3555-3563.
- Pascual-Ahuir A., Serrano R., and Proft M. (2001a) Sko1-repressor and Gcn4-activator antagonistically modulate stress-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **21**:15-25.

Pascual-Ahuir A., Posas F., Serrano R., and Prof M. (2001b) Multiple levels of control regulated the Yeast cAMP-response element-binding protein repressor Sko1 in response to stress. *J. Biol. Chem.* **276**:37373-37378.

Posas F., Wurgley-Murphy S. M., Maeda T., Witten E. A., Thai T. C., and Saito H. (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSk1 "two component" osmosensor. *Cell* **86**:865-875.

Posas F., and Saito H. (1997) Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**:1702-1705.

Posas F., and Saito H. (1998) Activation of the yeast SSk2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two component response regulator. *EMBO J.* **17**:1385-1394.

Posas F., Chambers J. R., Heyman J. A., Hoeffler J. P., de Nadal E., and J Ariño. (2000) The transcriptional response of yeast to saline stress. *J. Biol. Chem.* **275**:17249-17255.

Proft M., and Serrano R. (1999) Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1 confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol. Cell. Biol.* **19**:537-546.

Proft M., Pascual-Ahuir A., de Nadal E., Ariño J., Serrano R., and Posas F. (2001) Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J.* **20**:1123-1133.

Proft M., and Struhl K. (2002) Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator ha recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol. Cell.* **9**:1307-1317.

Proft M., and Struhl K. (2002) MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Mol. Cell.* **118**:351-361.

Prista C., and Madeira-Lopes A. (1995) Thermokinetic and energetic profiles of the yeast *Debaryomyces hansenii* in the presence of sodium chloride. *Biot. Letters.* **17**: 1233-1236.

Ptashne M. (1988) How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature.* **335**: 683-689.

Rai R., Daugherty J. R., Cunningham T. S., and Cooper T. G. (1999) Overlapping positive and negative GATA factor binding sites mediate inducible *DAL7* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* **274**: 28026-28034.



Raitt D.C., Posas F., and Saito H. (2000) Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *EMBO J.* **19**:4623-4631.

Reed R. H., Chudek J.A., Foster R., and Gadd G.M. (1987) Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeast. *Appl Env Microbiol.* **53**: 2119-2123.

Rep M., Albertyn J., Thevelein J. M., Prior B. A., and Hohmann S. (1999) Different signalling pathways contribute to the control of *GPD1* gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.* **145**:715-727.

Rep M., Reiser V., Gartner U., Thevelein J. M., Hohmann S, Ammerer G, and Ruis H. (1999) Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol. Cel. Biol.* **19**:5474-5485.

Rep M., Krantz M., Thevelin J. M., and Hohmann S. (2000) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. *J. Biol. Chem.* **275**:8290-8300.

Rep M., Proft M., Remize F., Tamás M., Serrano R., Thevelein J. M., and Hohmann S. (2001) The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1 transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Mol. Microbiol.* **40**:1067-1083.

Ruis H., and Schüller C. (1995) Stress signaling in yeast. *BioEssays.* **17**:959-965.

Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sánchez-Martinez C., and Perez Martin J. (2001) Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*- similar inputs, different outputs. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 214-221.

Schüller C., Brewster J. L., Alexander M. R., Gustin M. C., and Ruis H. (1994) The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene. *EMBO J.* **13**:4382-4389.

Sutherland F., Lages C., Lucas C., Luyten K., Alberty J., Hohmann S., Prior B. A., and Kilian S. G. (1997) Characteristics of Fps1- dependent and -independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**: 7790-7795.

Stanbrough M., Rowen D. W., Magasanik B. (1995) Role of the GATA factors Glnep and Nil1p of *Saccharomyces cerevisiae* in the expression of nitrogen-regulated genes. *P. N. A. S.* **92**:9450-9454.



Svetlov V. V., and Cooper T. G. (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* GATA factors Dal80 and Deh1 can form homo- and heterodimeric complexes. *J. Bacteriol.* **180**:5682-5688.

Tamás M. J., Rep M., Thevelin J. M., and Hohmann S. (2000) Stimulation of the yeast high osmolarity glycerol (HOG) pathway: evidence for a signal generated by a change in turgor rather than by water stress. *FEBS Lett.* **472**:159-165.

Tokuka K. (1993) Sugar and salt tolerant yeast. *J of Appl Bacteriol* **74**: 101-110.

Thóme P.E., Peña A., and Ramírez J. (1998) Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* growth at high concentrations of KCl and NaCl. *Yeast.* **14**: 1355-1371.

Thóme P.E., and Trench R. K. (1999) Osmoregulation and genetic induction of glycerol-3-phosphate dehydrogenase by NaCl in euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii*. *Mar. Biotechnol.* **1**: 230-238.

Thóme P.E. (2004) Isolation of a *GPD* gene from *Debaryomyces hansenii* encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>). *Yeast.* **21**: 119-126.

Varela J. C. S., and Mager W. H. (1996) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to changes in external osmolarity. *Microbiol.* **142**:721-731.

Varela, J.C.S., van Beekvelt C. A., Planta R. J., and Mager W. H. (1992) Osmostress-induced changes in yeast gene expression. *Mol. Microbiol.* **6**:2183-2190.

Wurgler-Murphy S.M., Maeda T., Witten E. A., and Saito H. (1997) Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Mol. Cel. Biol.* **17**:1289-1297.

Wuytswinkel O.V., Reiser V., Siderius M., Kelders M. C., Ammerer G., Ruis H., and Mager W. H. (2000) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway. *Mol. Microbiol.* **37**:382-397.

Yancey PH., Clark M. E., Hand S. C., Buwlus R. D., and Somero G. N. (1982) Living with waters stress: evolution of osmolyte systems. *Science.* **217**: 1214-1222.

Yale J., and Bohner H. J. (2001) Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *J. Biol. Chem.* **276**:15996-16007.

Yavad J.S, and Loper J.C. (1999) Multiple P450alk (cytochrome P450 alkane hydroxylase) genes from the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Gene* **226**: 139-146.

## VIII. APÉNDICE I

### Preparación de cromosomas para la electroforésis de cromosomas en campos pulsados (PFGE).

- 1.- Las células son cultivadas en 50 ml de YPD, durante toda la noche.
- 2.- Las células son cosechadas y lavadas una vez con EDTA-Na (50 mM pH8).
- 3.- Se disuelven las células en 2 ml de solución de EDTA-Na 50 mM más 100µg de Liticasa.
- 4.- 1 ml de la solución antes preparada se mezcla con una solución de agarosa de bajo punto de fusión preparada al 1.5% en EDTA-Na 125mM pH8
- 5.- La suspensión fue distribuida en el preparador de bloques -quedando embebidas las células en la agarosa- del equipo de BioRAD (CHEF Mapper DRII). Se dejaron solidificar los bloques de agarosa durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 6.- En un tubo falcón de 50 ml se ponen los bloques de agarosa, se les agrega 5 ml del amortiguador TES (EDTA-Na 50mM pH8, 2-mercaptoetanol al 7.5%, Tris 10mM pH8) y se incuban a 37<sup>0</sup>C durante 3 horas. Se lavan 3 veces con TS (EDTA-Na 50 mM pH8, Tris 10 mM pH8)
- 7.- El amortiguador TES es remplazado por 5 ml de amortiguador ESP (EDTA-Na 50 mM pH 8, Sarkosil al 1%, proteinasa K 1 mg por ml).
- 8.- Los bloques se incuban durante toda la noche a 50<sup>0</sup>C.
- 9.- Lavar los bloques con 5 ml de amortiguador ES (EDTA-Na 50mMpH8, Sarkosil al 1%) tres veces.
- 10.- Resuspender los bloques en 5 ml de amortiguador ES y guardar a 4<sup>0</sup>C.

### **Electroforésis de los cromosomas en el equipo de BioRad-CHEF-DRII.**

1.- Preparar un gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio 1µg/ml, en la charola del equipo CHEF-DRII, prepara un carril en todo el gel (al peine de equipo pegarle cinta adhesiva para formar un solo carril), de esta manera es más fácil poner los bloques.

2.- Cargar la mitad de uno de los bloques preparados, sellar con agarosa de bajo punto de fusión para evitar la salida de los bloques.

3.- Correr en amortiguador TBE 0.5X, con las siguientes condiciones:

	<b>PULSOS</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>VOLTAJE</b>
<b>Modulo 1</b>	90 -300	22horas	95
<b>Modulo 2</b>	300-900	60horas	95

### **Souther blot de Cromosomas.**

1.- Antes de transferir el gel tomar un fotografía.

2.- Transferir el gel de cromosomas utilizando lo siguiente:

-Preparar 500ml de solución de NaOH 4 N

-Cortar membrana de transferencia de Nylon plus.

-Preparar equipo de transferencia

3.- Montar la transferencia utilizando lo antes mencionado.

4.- Dejar la transferencia durante dos días.

5.- Una vez terminada la transferencia, lavar la membrana con SCC 10X por 10 segundos.



## IX. RESULTADOS PUBLICADOS

Carlos A. Guerrero · Cristina Aranda  
Alexander DeLuna · Patrizia Filetici · Lina Riego  
Víctor Hugo Anaya · Alicia González

## Salt-dependent expression of ammonium assimilation genes in the halotolerant yeast, *Debaryomyces hansenii*

Received: 23 November 2004 / Revised: 14 December 2004 / Accepted: 15 December 2004 / Published online: 27 January 2005  
© Springer-Verlag 2005

**Abstract** *Debaryomyces hansenii* is adapted to grow in saline environments, accumulating high intracellular  $\text{Na}^+$  concentrations. Determination of the *DhGDH1*-encoded NADP-glutamate dehydrogenase enzymatic activity showed that it increased in a saline environment. Thus, it was proposed that, in order to overcome  $\text{Na}^+$  inhibition of enzyme activity, this organism possessed salt-dependent mechanisms which resulted in increased activity of enzymes pertaining to the central metabolic pathways. However, the nature of the mechanisms involved in augmented enzyme activity were not analyzed. To address this matter, we studied the expression of *DhGDH1* and *DhGLN1* encoding glutamine synthetase, which constitute the central metabolic circuit involved in ammonium assimilation. It was found that: (1) expression of *DhGDH1* is increased when *D. hansenii* is grown in the presence of high NaCl concentrations, while that of *DhGLN1* is reduced, (2) *DhGDH1* expression in *Saccharomyces cerevisiae* takes place in a *GLN3*- and *HAP2,3*-dependent manner and (3) salt-dependent *DhGDH1* and *DhGLN1* expression involves mechanisms which are limited to *D. hansenii* and are not present in *S. cerevisiae*. Thus, salt-dependent regulation of the genes involved in central metabolic pathways could form

part of a strategy leading to the ability to grow under hypersaline conditions.

**Keywords** Ammonium assimilation · Glutamate dehydrogenase · Glutamine synthetase · Hyperosmotic stress · *DhGDH1* · *DhGLN1*

### Introduction

When yeasts are grown under high NaCl concentrations, a complex cellular response is elicited. The best studied systems involved in this response are those present in organisms like *Saccharomyces cerevisiae*, which induce mechanisms for sodium exclusion from the cytoplasm and increase the production of compatible solutes (Almagro et al. 2001; Blomberg and Adler 1989; Lages et al. 1999). The high osmolarity glycerol MAP kinase pathway of the yeast *S. cerevisiae* mediates the expression of a particular gene network whose products are specifically needed to withstand NaCl-dependent stress (Hohmann 2002). Upon a saline shock, expression of a rather small group of genes is modified, resulting in the production of glycerol and stress-protective proteins (Hohmann 2002). Although *S. cerevisiae* is considered an important model to study the transcriptional transient response to saline shock, studies of the long-term evolutionary adaptation to the presence of salt in the environment, which should operate in halotolerant yeasts, could increase our understanding of this phenomenon.

*Debaryomyces hansenii* is one of the most halotolerant species of yeast (Bansal and Mondal 2000) and it is considered a halophile, able to grow in media containing a wide range of salt concentrations, including sea water, meat, wine, beer, fruits and soil (Barnett et al. 2000). As with *S. cerevisiae*, when *D. hansenii* is grown in the presence of high salt concentrations, increased tran-

Communicated by S. Hohmann

C. A. Guerrero · C. Aranda · A. DeLuna · L. Riego  
V. H. Anaya · A. González (✉)  
Departamento de Genética Molecular,  
Instituto de Fisiología Celular,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Mexico City, 04510, Mexico  
E-mail: amanjarr@ifc.unam.mx  
Tel.: +52-5-556225631  
Fax: +52-5-556225630

P. Filetici  
Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare,  
Centro de Studio per gli Acidi Nucleici,  
Università "La Sapienza", 00185 Rome, Italy



scriptional activation of *DhGPD* (encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase) is observed (Lucas et al. 1990; Thomé and Trench 1999). However, in contrast to other yeasts, *D. hansenii* is able to accumulate high  $\text{Na}^+$  concentrations without harmful effect. It is proposed that the action of a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  non-selective channel and one or more  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  uniporters constitute the systems through which *D. hansenii* is able to accumulate  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  (González-Hernández et al. 2004; Prior et al. 1996). In addition, the existence of a glycerol/ $\text{Na}^+$  symporter could also contribute to cation uptake (Lucas et al. 1990). However, *D. hansenii* possesses two genes encoding  $\text{Na}^+$ -ATPases (*DhENA1*, *DhENA2*), which are involved in  $\text{Na}^+$  extrusion (Almagro et al. 2001). It is suggested that, unlike what happens in *S. cerevisiae*, the Ena proteins in *D. hansenii* do not determine  $\text{Na}^+$  extrusion but could play an important role in maintaining balanced levels of intracellular cations, ensuring the ionic homeostasis of the cell (Almagro et al. 2001). These results indicate that the capacity of *D. hansenii* to adapt to saline environments is not due to the operation of a particular  $\text{Na}^+$  extrusion system, but is due to mechanisms leading to an intrinsic resistance to the toxic effects of this cation, which have not been observed in other yeasts (González-Hernández et al. 2004).

In halophilic organisms like *D. hansenii*, the expression of genes encoding enzymes of the central metabolic pathways can be modulated in order to increase transcription and enzyme synthesis, thus overcoming the negative effect of  $\text{Na}^+$  ions on enzymatic activity. In this regard in *D. hansenii*, it was found that the activity of NADP-glutamate dehydrogenase (NADP-GDH; EC 1.4.1.4); involved in glutamate biosynthesis and ammonium assimilation, increased several-fold when this yeast was grown in the presence of 0.6 M NaCl (Alba-Lois et al. 2004). However, the nature of the mechanisms leading to increased enzymatic activity were not studied. To address this matter, we analyzed the expression of the *DhGDH1* encoding NADP-GDH and that of the *D. hansenii* *GLN1* homologous gene, *DhGLN1*, encoding glutamine synthetase.

Like most free-living microorganisms, *S. cerevisiae* possesses amino acid biosynthetic pathways that allow the cell to use ammonium as sole nitrogen source. Ammonium utilization occurs exclusively via its incorporation into glutamate and glutamine, a process that can be achieved by two metabolic routes. One of these is

constituted by the concerted action of glutamine synthetase (EC 6.3.1.2) and the *GLT1*-encoded glutamate synthase (Magasanik 2003). The other pathway is mediated by the  $\text{NADP}^+$ -dependent NADP-GDH, a broadly distributed enzyme that catalyzes the reductive amination of  $\alpha$ -ketoglutarate to form glutamate (Holzer and Schneider 1957; Magasanik 2003). In *S. cerevisiae*, two genes (*GDH1*, *GDH3*) have been described whose products constitute NADP-GDH isoenzymes (Avenidaño et al. 1997), although in glucose grown cultures, *GDH3* expression is completely repressed and its encoded enzyme plays no role under this condition (DeLuna et al. 2001). We cloned the homologous genes *DhGDH1* and *DhGLN1* from *D. hansenii* and analyzed their expression under hyperosmotic conditions. Our results show that: (1) *DhGDH1* and *DhGLN1* are able to complement the function of the corresponding genes in *S. cerevisiae*, (2) in *D. hansenii*, *DhGDH1* expression increases several-fold in the presence of NaCl, while that of *DhGLN1* decreases, (3) the Gln3p and HAP-like transcriptional activators of *D. hansenii* can determine *DhGDH1* salt-independent expression in this yeast and (4) *DhGDH1* and *DhGLN1* salt-regulated expression in *D. hansenii* could be afforded by the action of a particular mechanism not present in *S. cerevisiae*, since the heterologous expression of *DhGDH1* and *DhGLN1* is not NaCl-modulated.

## Materials and methods

### Yeast strains and growth conditions

Table 1 describes the characteristics of the strains used in this study. *S. cerevisiae* strains CLA1 (Valenzuela et al. 1998), CLA13 and CLA14 (DeLuna et al. 2001) were independently transformed with plasmid pDhGDH1-1 (*DhGDH1 CEN6 ARS4 URA3*) or pDhGDH1-2 (*DhGDH1-lacZ 2 $\mu$  URA3*) by lithium acetate treatment (Ito et al. 1983). *S. cerevisiae* strains CLA-101 (Valenzuela et al. 1998), BWG1-7A, LWG1 and HP40 (Forsburg and Guarente 1989) were transformed with plasmid pDhGDH1-2. The *S. cerevisiae* glutamine auxotroph, strain CNI (González et al. 1985) was transformed with a genomic library from *D. hansenii* Y7426 (kindly provided by Dr. Roberto Coria) prepared in the  $2\mu$  vector YEp352 containing 10-kbp inserts. This

**Table 1** Strains used in this work

Strain	Relevant genotype	Source
Y7426	<i>D. hansenii</i> wild type	Alba-Lois et al. (2004)
CLA1	<i>MATx GDH3 GLT1 ura3 leu2</i>	Valenzuela et al. (1998)
CLA13	<i>MATx gdh1<math>\Delta</math>::kanMX4 GDH3 LEU2::YIp 351 ura3</i>	DeLuna et al. (2001)
CLA14	<i>MATx gdh1<math>\Delta</math>::kanMX4 gdh3<math>\Delta</math>::LEU2 ura3</i>	DeLuna et al. (2001)
CLA-101	<i>MATx GDH1 GDH3 GLT1 gln3<math>\Delta</math>::URA3 leu2</i>	Valenzuela et al. (1998)
BWG1-7A	<i>MATa HAP2 HAP3</i>	Forsburg and Guarente (1989)
LWG1	<i>MATa hap2<math>\Delta</math> HAP3</i>	Forsburg and Guarente (1989)
HP40	<i>MATa HAP2 hap3<math>\Delta</math></i>	Forsburg and Guarente (1989)
CNI	<i>MATa ino gln1</i>	González et al. (1985)



allowed the isolation of *S. cerevisiae* clones harboring plasmids bearing the *GLN1* homologous gene from *D. hansenii*. Yeasts were routinely grown on rich medium (YPD) containing 2% glucose, 1% yeast extract (Difco) and 2% peptone (Difco). For *S. cerevisiae*, minimal medium (MM) was prepared following the formula of yeast nitrogen base (Difco). Filter sterilized glucose (2%) was used as the carbon source and 0.75% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 0.1% asparagine or 0.1% proline was used as nitrogen source. Amino acids needed to satisfy auxotrophic requirements were added at a final concentration of 0.01%. For *D. hansenii*, a different minimal medium (MM-D) was prepared following the formula described by Norkrans (1966), using 0.1% asparagine as nitrogen source. Cells were grown at 30°C with shaking (250 rpm).

#### PCR amplification of *D. hansenii* genomic DNA

To amplify the presumed 5' regulatory region of the *DhGDH1* gene, a collection of five random decamers from RNAmapping kit A (catalogue no. M501; GeneHunter Corp.) was used as forward deoxyoligonucleotide, and S3 (5'-GTA GAG TCT TCT AAA GCA-3') was used as reverse deoxyoligonucleotide (18 bp in length, starting from the ATG translation initiation site). Several MgCl<sub>2</sub> concentrations were used in order to decrease annealing specificity. Qiagen-purified *D. hansenii* genomic DNA was used as template for PCR amplification with the following program: one denaturing cycle for 3 min at 95°C, followed by 30 cycles of 1 min denaturation at 95°C, 1 min annealing at 37°C and 2 min extension at 68°C, with a final 5 min extension at 68°C. Southern blot analysis allowed the identification of a 1,000-bp product which was recognized by the *DhGDH1* probe. This product was subcloned on vector pGEM-T easy vector system I (Promega) and sequenced. Sequence analysis revealed this fragment contained 40 bp of the *DhGDH1* coding sequence and a 5' 1,000-bp fragment, which could correspond to the regulatory region. To clone the full-length *DhGDH1* gene with its complete coding sequence and a 1,000-bp 5' regulatory region, a pair of deoxyoligonucleotides was designed. The S4 forward deoxyoligonucleotide (5'-GCG CGC gaa ttc *TAT TTG GTA GTT CTC CCC G*-3') contained a GCG tail, an *EcoRI* restriction site (lowercase) and 25 bp of the presumed *DhGDH1* regulatory sequence (italics). The S5 reverse deoxyoligonucleotide (5'-GCG CGC gga tcc *GCG GCA AAT CTA TGC TTC C*-3') contained a GCG tail, a *BamHI* restriction site (lowercase) and 25 bp of the most 3'untranslated region neighboring the carboxy-terminal region of the *DhGDH1* fragment (italics), as reported in the Genolevures Database (Lépingle et al. 2000; Sherman et al. 2004). Qiagen-purified *D. hansenii* genomic DNA was used as template for PCR amplification with the following program: 3 min denaturing at 95°C, followed by 5 cycles of 1 min denaturing at 95°C, 1 min

annealing at 60°C and 3 min extension at 72°C, followed by 30 cycles of 1 min denaturing at 95°C, 1 min annealing at 68°C, 3 min extension at 72°C, with a final 10 min extension at 72°C. A 2,700-bp fragment was obtained, subcloned in plasmid pRS316 and sequenced. The sequence obtained was deposited in GenBank with the accession number AY005438.

Probes for Northern blot analysis were prepared as follows. For *DhGDH1* detection, a 1,257-bp *SacI-EcoRI* fragment from the *DhGDH1* coding sequence was obtained from plasmid pDhGDH1-1. For *DhGLN1* detection, a 900-bp fragment of *DhGLN1* was obtained by PCR-amplification of *D. hansenii* genomic DNA using deoxyoligonucleotides B1 (5'-ACG GTA AGG TGT TAG CCG-3') and B2 (5'-ACC ATA GCC TTC CTT GGC-3') designed from the sequence obtained and deposited in GenBank with accession number AY680952. A 1,800-bp fragment of the 18S rDNA was obtained as reported by Govind et al. (1992). An 864-bp fragment of *IPP1* from *S. cerevisiae* was obtained using primer pair C1 (5'-ATG ACC TAC ACT ACC AGA-3') and C2 (5'-TTA AAC AGA ACC GGA GAT-3') (Pérez-Castineira et al. 2002) and was used as a probe on membranes of *S. cerevisiae* total RNA. An 800-bp fragment from the *S. cerevisiae GDH1* or *GLN1* coding region was obtained as previously reported (Benjamin et al. 1989; Riego et al. 2002). All PCR products were sequenced with an automated Applied Biosystems 3100 genetic analyzer.

#### Preparation of cell-free extracts and determination of NADP-GDH and $\beta$ -galactosidase activities

Whole-cell soluble protein extracts were prepared by glass bead lysis of cell pellets harvested during exponential growth (Cogoni et al. 1995). NADP-GDH was assayed by the method of Doherty (1970) and Alba et al. (2004). One unit of activity was defined as the oxidation of 1.0  $\mu$ mol min<sup>-1</sup> NADPH.  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal) was determined as described by Valenzuela et al. (1998). One unit of  $\beta$ -Gal corresponded to the production of 1 nmol min<sup>-1</sup> *o*-nitrophenol. Protein was measured by the method of Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as a standard.

#### Construction of a *DhGDH1-lacZ* fusion

Cloning of the *D. hansenii DhGDH1* gene led to the construction of plasmid pDhGDH1-1, harboring a 2,700-bp DNA fragment containing the full-length *DhGDH1* coding sequence and its regulatory region. An *EcoRI-HindIII* digestion allowed cloning of a 1,000-bp DNA fragment containing the presumed regulatory region, which was fused in frame to the *Escherichia coli lacZ* gene of YEp353 (2 $\mu$  *URA3*; Myers et al. 1986), generating plasmid pDhGDH1-2. This plasmid was se-



quenced with an automated Applied Biosystems 3100 genetic analyzer.

#### Primer extension RNA analysis

Primer extension reactions were performed by standard procedures (Sambrook et al. 1989). To determine the chromosomal *DhGDH1* transcription initiation site, total RNA was isolated from *D. hansenii* strain Y7426 grown on YPD. A deoxyoligonucleotide containing the first 21 nucleotides of the *DhGDH1* coding region was prepared and used in primer extension reactions.

#### Northern blot analysis

Northern blot analysis was carried out by preparing total RNA from 100-ml cultures, as described by Struhl and Davis (1981). Filters were sequentially hybridized with different probes for 18 h, followed by washing with a ten-fold dilution of 20× SSC (1× SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate) containing 0.1% SDS at 65°C for 30 min. The signal was quantified using Typhoon 840 and Image Quant ver. 5.2 software (Molecular Dynamics).

## Results

### *DhGDH1* gene from *D. hansenii* complements a *gdh1* deletion in *S. cerevisiae*

The putative *GDH1* gene from *D. hansenii* (*DhGDH1*) was cloned by a combination of three PCR amplification reactions carried out on *D. hansenii* genomic DNA, as described in Materials and methods. In order to obtain a construct allowing *DhGDH1* expression from its own promoter, the 2,700-bp fragment harboring the full *DhGDH1* coding region and a 1,000-bp 5' regulatory region was subcloned in the low-copy-number plasmid pRS316 (*CEN6 ARS4 URA3*; Sikorski and Hieter 1989), generating plasmid pDhGDH1-1 which was transformed into *S. cerevisiae* mutant strain CLA14 (*gdh1Δ gdh3Δ GLT1*). In the absence of salt, CLA14/pDhGDH1-1 grew as the wild-type *S. cerevisiae* strain (CLA1), while the mutant strains CLA14/pRS316

(harboring the empty vector) and CLA14 grew with a lower growth rate (Table 2). As shown earlier (Alba-Lois et al. 2004), the wild-type *D. hansenii* strain showed a growth rate which was almost three-fold lower than that displayed by the *S. cerevisiae* wild-type strain. A five-fold higher NADP-GDH enzymatic activity could be determined in extracts of the *S. cerevisiae* CLA1 wild-type strain, as compared with that detected in *D. hansenii* strain Y7426, suggesting that, on ammonium as nitrogen source, *D. hansenii* displayed a lower intrinsic *DhGDH1* expression or enzymatic activity than that found for *S. cerevisiae GDH1* or Gdh1p. The fact that the CLA14/pDhGDH1-1 strain showed a ten-fold higher NADP-GDH activity than *D. hansenii* strain Y7426 (Table 2) suggests that the limited expression of *DhGDH1* was enhanced in the heterologous background, thus allowing full complementation of growth deficiency in the *S. cerevisiae gdh1Δ gdh3Δ* mutant. This effect cannot be attributed to a copy-number effect, since *DhGDH1* was cloned in a low-copy-number plasmid, which could at most double the enzyme activity, suggesting that the transcriptional machinery of *S. cerevisiae* efficiently recognizes the heterologous regulatory region. These results show that the cloned *DhGDH1* gene encoded a NADP-GDH from *D. hansenii* and that the heterologous gene was fully expressed in the *S. cerevisiae* background. However, the two-fold higher expression of NADP-GDH observed in the CLA14/pDhGDH1-1 strain as compared with the CLA1 wild-type strain could be attributed to a copy-number effect in plasmid pRS316. As reported by Alba-Lois et al. (2004), the enzymatic activity detected in *D. hansenii* was two-fold higher in the presence of 0.6 M NaCl, compared with growth in the absence of NaCl. However, extracts obtained from CLA14/pDhGDH1-1 grown in the presence of NaCl showed a four-fold lower enzymatic activity, as compared with that found without added NaCl. This suggests that either, in a *S. cerevisiae* background, the *DhGDH1*-encoded enzyme was sensitive to NaCl, or *DhGDH1* expression was repressed when *S. cerevisiae* was grown under hypersaline conditions. Table 2 also shows that, in the presence of salt, the CLA14/pDhGDH1-1 strain displays a growth rate equivalent to that observed in the wild-type strain grown on 0.6 M NaCl, indicating that expression of the *DhGDH1* gene in *S. cerevisiae* does not confer higher halotolerance to this yeast.

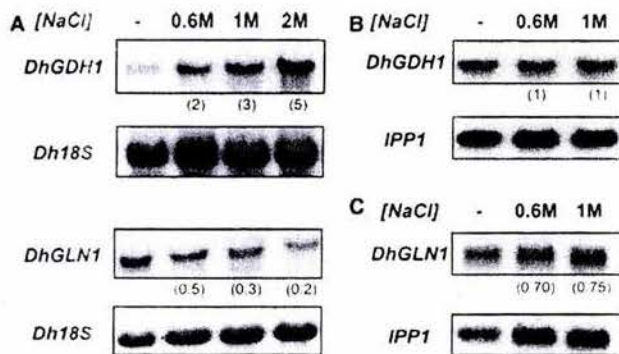
**Table 2** Growth rates and GDH activities of strains lacking *GDH1* or expressing *DhGDH1*. Data presented are means of three independent experiments. Variations were ≤ 15%. *NH<sub>4</sub>* Ammonium sulfate (0.75%), *ND* not detected

	Growth rate (h <sup>-1</sup> )		NADP-GDH specific activity (μmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	
	<i>NH<sub>4</sub></i>	<i>NH<sub>4</sub></i> + 0.6-M NaCl	<i>NH<sub>4</sub></i>	<i>NH<sub>4</sub></i> + 0.6-M NaCl
<i>D. hansenii</i> Y7426 ( <i>GDH1</i> )	0.114	0.115	0.12	0.29
<i>S. cerevisiae</i> CLA1 ( <i>GDH1 GDH3 ura3 leu2</i> )	0.304	0.138	0.64	0.48
<i>S. cerevisiae</i> CLA14 ( <i>gdh1Δgdh3Δ</i> )	0.215	0.086	ND	ND
<i>S. cerevisiae</i> CLA14 ( <i>gdh1Δgdh3Δ/pRS316</i> )	0.207	0.086	ND	ND
<i>S. cerevisiae</i> CLA14 ( <i>gdh1Δgdh3Δ/pDhGDH1-1</i> )	0.308	0.138	1.31	0.34

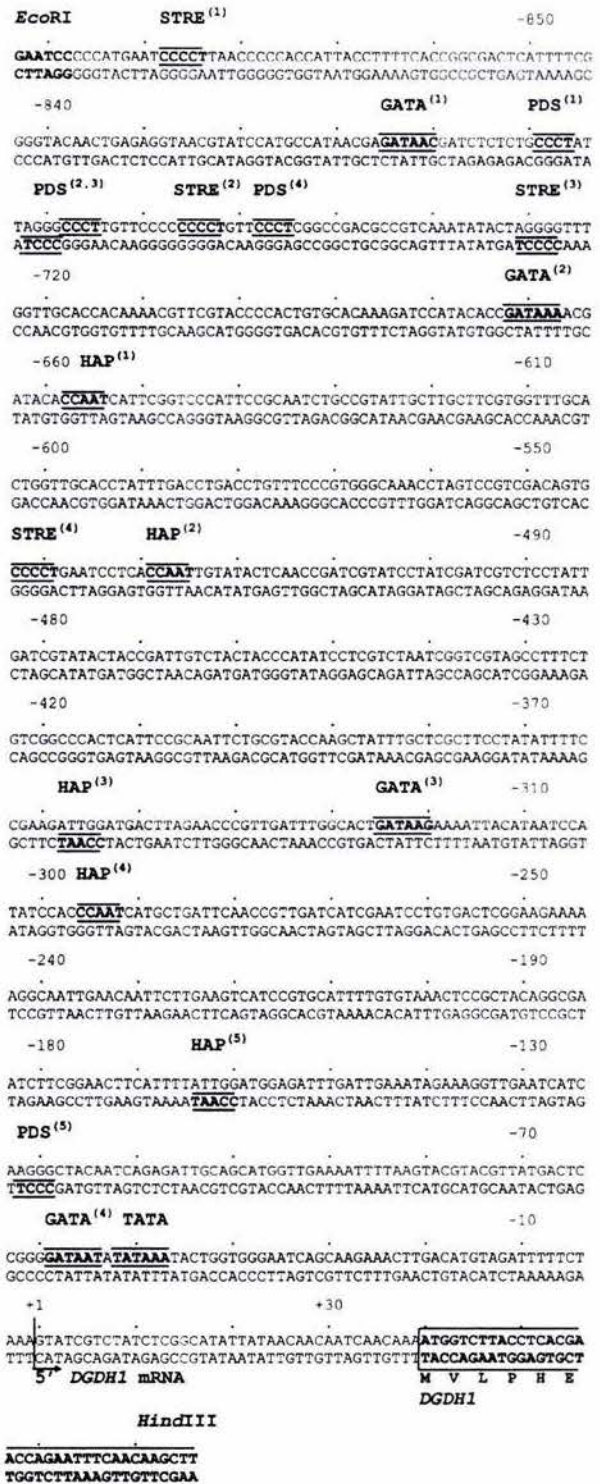


*DhGDH1* expression is induced under hypersaline conditions

To determine whether the observed salt-dependent increase in NADP-GDH activity corresponded to higher *DhGDH1* expression in *D. hansenii*, Northern blot analysis was performed on total RNA extracted from this yeast grown on MM-D with 0.75% ammonium sulfate as nitrogen source with or without NaCl at various concentrations. Increased *DhGDH1* expression was detected with increased concentrations of NaCl (Fig. 1a). These results indicated that augmented NADP-GDH activity could be the result of increased *DhGDH1* expression. Northern blot analysis of *DhGDH1* expression was also carried out on total RNA obtained from the *S. cerevisiae* *gdh1Δ gdh3Δ* mutant carrying plasmid pDhGDH1-1. *DhGDH1* expression did not respond to increasing NaCl concentration in the medium (Fig. 1b). Accordingly, similar  $\beta$ -Gal activity was obtained in extracts from the *S. cerevisiae* *gdh1Δ gdh3Δ* carrying pDhGDH1-2 grown on MM or in MM + 0.6 M NaCl (1,400 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> vs 1,350 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>). Taken together, these results indicate that the *DhGDH1* gene from *D. hansenii* does not respond to NaCl in a *S. cerevisiae* background. Inspection of the *DhGDH1* promoter showed that it carries four PDS cis-acting elements (CCCT) and four stress response (STRE) elements with CCCCT as the core sequence (Fig. 2). These two motifs are considered to play an important role in stress response in *S. cerevisiae* (Gustin et al. 1998). However, these cis-acting elements are not present in the *S. cerevisiae* *GDH1* promoter and expression of this gene is not stress-dependent (Riego et al. 2002; Gasch and Werner-Washburne 2002). Since *DhGDH1* salt-dependent expression was not observed in



**Fig. 1** *DhGDH1* and *DhGLN1* salt-dependent expression. Northern blots of total RNA prepared from cultures of a *D. hansenii* strain Y7426, b *S. cerevisiae* strain CLA1/pDhGDH1-1, and c *S. cerevisiae* strain CNI/pDhGLN1-1, grown on MM with 0.75% ammonium sulfate as nitrogen source, supplemented with various NaCl concentrations. Each filter was sequentially probed with specific DNA fragments of: a *DhGDH1* and *DhGLN1*, with *Dh18S* as loading control (Govind et al. 1992), b *DhGDH1*, c *DhGLN1*. *IPP1* was used as the loading control for b, c (Perez-Castineira et al. 2002). Numbers in parentheses indicate quantitative values after normalizing with loading control



**Fig. 2** *DhGDH1* presumed promoter sequence. Putative Gcn4p (*GCN4*), Gln3p and Gat1p (*GATAA*), HAP complex (*CCAAT*) binding sites and STRE and PDS cis-acting regions are boxed and numbered, starting from the most 5'. One putative TATA box (*TATAAA*) and the transcription initiation site at position +1 are indicated



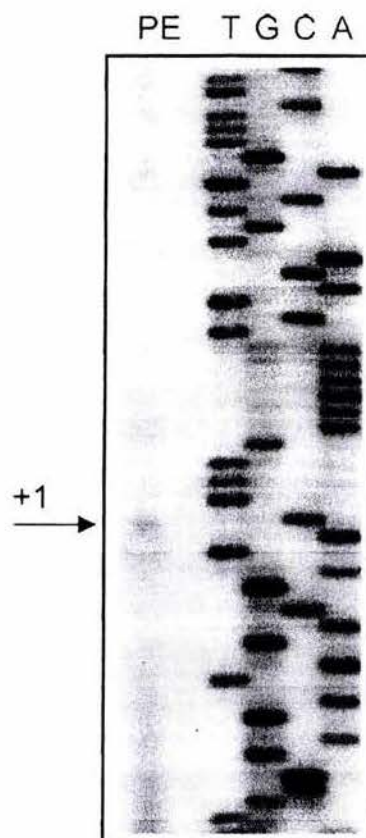
a *S. cerevisiae* background, it can be concluded either that the PDS or STRE elements are not recognized by the heterologous transcriptional machinery, or that the salt-dependent response is only achieved in a *D. hansenii* background through the action of specific *cis*- and *trans*-acting factors not present in *S. cerevisiae*.

Considering that the *GLN1*-encoded enzyme constitutes an alternative pathway for ammonium assimilation, we decided to analyze whether, like *DhGDH1*, expression of the *GLN1* gene from *D. hansenii* (*DhGLN1*) was induced in a salt-dependent manner. *DhGLN1* was cloned by complementing a *S. cerevisiae* glutamine auxotroph. *S. cerevisiae* strain CN1 (*gln1*; González et al. 1985) was transformed with a *D. hansenii* genomic library constructed in a *S. cerevisiae* multicopy plasmid. Sequencing of the insert present in one of the complementing plasmids established that pDhGLN1-1 harbored the full-length *DhGLN1* coding sequence and a 5' 500-bp regulatory region. In *S. cerevisiae*, lack of *GLN1* results in complete glutamine auxotrophy (González et al. 1985); and thus the fact that the CN1 mutant strain recovered wild-type growth in the absence of glutamine showed that *DhGLN1* was expressed in *S. cerevisiae*. To determine whether *DhGLN1* expression was affected under hypersaline conditions, Northern blot analysis was carried out on total RNA from *D. hansenii*. It was found that increasing NaCl concentrations down-regulated *DhGLN1* expression (Fig. 1a). The effect of salt on *DhGLN1* transcriptional regulation was not observed in the *S. cerevisiae* heterologous background (Fig. 1c), suggesting that, as found for *DhGDH1*, the mechanisms allowing salt regulated expression in *D. hansenii* are not present in *S. cerevisiae*.

#### *DhGDH1* salt-independent expression is Gln3p-HAP-dependent in *S. cerevisiae*

To determine whether the *S. cerevisiae* transcriptional machinery could identify and act upon the *DhGDH1* promoter (since it was shown that *GDH1* expression in *S. cerevisiae* was mainly determined by the *GLN3*-encoded activator and the HAP complex), we decided to analyze whether the presumed *DhGDH1* regulatory region harbored the pertinent *cis*-acting elements and whether heterologous *DhGDH1* salt-independent expression was Gln3p and HAP complex-dependent.

In order to gain information with regard to the organization of the *DhGDH1* promoter, the transcription initiation site was determined (Fig. 3) and found to be located 46 bp from the putative TATA-binding element depicted in Fig. 2. The study of the transcriptional regulation of the *S. cerevisiae* *GDH1* gene showed that its expression was dictated by the nature of the nitrogen and carbon sources, through the action of the Gln3p and HAP complexes, respectively acting on the GATAA and HAP *cis*-acting elements. Inspection of the *DhGDH1* regulatory region revealed that it contained four GATAA motifs and five sequences that could constitute

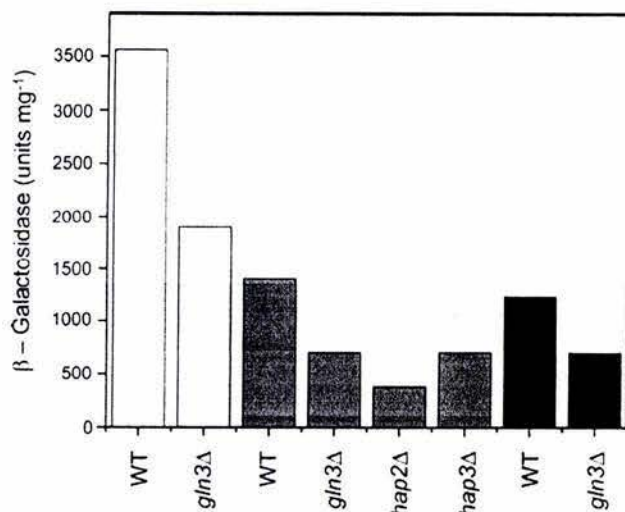


**Fig. 3** Determination of the transcription initiation site of *DhGDH1*. Representative results of primer extension analysis carried out with total RNA obtained from *D. hansenii* strain Y7426 show the transcription initiation site of the *DhGDH1* gene (lane PE). The sequence ladder was produced with the same deoxyoligonucleotides used for the primer extension reaction (described in the Materials and methods)

HAP-binding sites (Fig. 2). To determine whether the *S. cerevisiae* factors involved in nitrogen and carbon regulation could act on the *DhGDH1* gene,  $\beta$ -Gal activity was assayed in extracts prepared from the CLA1 strain harboring plasmid pDhGDH1-2. It was found that *DhGDH1* expression was determined by the nature of the nitrogen source, being repressed in nitrogen-rich conditions and derepressed in poor nitrogenous substrates (Fig. 4). In a *S. cerevisiae* *gln3* $\Delta$  mutant harboring pDhGDH1-2, reporter activity was diminished, attaining 50% of that obtained in a wild-type strain, on the various nitrogen sources tested (Fig. 4). Expression of *DhGDH1* was also analyzed in the CLA13 *gdh1* $\Delta$  *GDH3* mutant strain harboring plasmid pDhGDH1-2. It was found that  $\beta$ -Gal activity in the mutant *DhGDH1* was five-fold increased, as compared with that found in the wild-type strain (7,000 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> vs 1,400 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>). These results suggest that as in *S. cerevisiae*, glutamate could negatively modulate *GDH1* expression (Riego et al. 2002).

When  $\beta$ -Gal was determined in *S. cerevisiae* *hap2* $\Delta$  or *hap3* $\Delta$  mutants harboring pDhGDH1-2, it was found





**Fig. 4** *DhGDH1* expression in the *S. cerevisiae* background is determined by the quality of the nitrogen source and is affected by the Gln3p transcriptional activator and the HAP complex.  $\beta$ -Gal activity was determined in extracts obtained from yeast cells harvested during exponential growth, using proline (white bars), ammonium sulfate (gray bars) or asparagine (black bars) as nitrogen source and glucose as carbon source. The various mutants harbor null mutations in genes encoding transcriptional activators. WT Wild type

that only 50% of the activity detected in the wild-type strain was observed in either of the two *hap* $\Delta$  mutant strains (Fig. 4). This suggests that, as found for the *S. cerevisiae* *GDH1* gene (Riego et al. 2002), *DhGDH1* expression could be HAP-controlled on glucose.

Taken together, the above-presented results show that the *S. cerevisiae* transcriptional machinery can act upon the *DhGDH1* promoter, suggesting that *S. cerevisiae* lacks the *trans*-acting elements needed to induce *DhGDH1* salt-dependent expression.

## Discussion

The marine yeast *D. hansenii* is able to grow in saline environments, accumulating high intracellular Na<sup>+</sup> concentrations; and thus it was proposed that its metabolic systems should be resistant to high salt concentrations (González-Hernández et al. 2004). It was recently found that the activity of NADP-GDH is five-fold increased when this microorganism is grown in the presence of NaCl, as compared with that detected in its absence (Alba-Lois et al. 2004). High NADP-GDH activity did not result in concomitantly increased glutamate pools, confirming previous observations indicating that, as opposed to what was found in some bacteria (Botsford et al. 1994), amino acids in this yeast play no role as osmolytes (Alder and Gustafson 1980). However, the fact that the *in vitro* salt tolerance of glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *D. hansenii* is higher with glutamate as the counter ion

than with a series of other counter ions (Nilsson and Adler 1990), it is possible that a transient glutamate accumulation occurring after a salt shock could play a role in the protection of enzymatic activities in this yeast, as observed in bacteria. Alternatively, it was proposed that increased NADP-GDH activity could reflect a higher enzyme synthesis, constituting a mechanism to buffer the inhibitory effect that Na<sup>+</sup> has on this enzyme (Alba-Lois et al. 2004). In order to study the possibility that NaCl-dependent gene expression could participate in the mechanism leading to high enzyme biosynthesis, the present study addressed the question of whether increased NADP-GDH could be related to an increase in expression and whether salt-dependent regulation could also affect expression of the glutamine synthetase-encoding gene, which is also involved in ammonium assimilation. Results presented in this paper show that *DhGDH1* expression is several-fold induced under hypersaline conditions, suggesting that augmented *DhGDH1* expression could constitute the driving force directing metabolism to the synthesis of amino acids under these conditions. It is worth mentioning that, although *GDH3* is glucose-repressed and its product is barely present in glucose-grown cultures, complementation experiments were carried out in a *gdh1* $\Delta$  *gdh3* $\Delta$  double mutant, in order to completely eliminate *S. cerevisiae* NADP-GDH activity. Thus, the fact that *DhGDH1* fully complemented the *gdh1* $\Delta$  *gdh3* $\Delta$  *S. cerevisiae* mutant indicated that the *DhGDH1*-encoded enzyme should be similar in capacity to the *GDH1*-encoded NADP-GDH1 from *S. cerevisiae* and not NADP-GDH3. Accordingly, a *gdh1* $\Delta$  *gdh3* $\Delta$  *S. cerevisiae* mutant is only complemented by *GDH1* and not by *GDH3*, which is unable to provide glutamate when *S. cerevisiae* is grown on glucose as carbon source (DeLuna et al. 2001). Although *S. cerevisiae* and many other microorganisms possess an alternative pathway for glutamate biosynthesis constituted by the concerted action of glutamine synthetase and glutamate synthase (GOGAT), this pathway only provides a discrete amount of glutamate and is regarded as a minor biosynthetic pathway (Cogoni et al. 1995). Thus, it can be speculated that *DhGDH1p* could constitute the main pathway for glutamate biosynthesis in *D. hansenii* and is consequently the one that could be modulated in order to sustain glutamate production and satisfy the biosynthesis of glutamate-derived amino acids. Results presented in this paper show that *DhGDH1* is expressed at the same level when *S. cerevisiae* cells are cultivated with or without NaCl. However, the detected enzymatic activity is decreased four-fold in the presence of 0.6 M NaCl, in comparison with growth in the absence of salt. This is in agreement with the suggestion that the *DhGDH1*-encoded NADP-GDH is salt-sensitive (Alba-Lois et al. 2004) and thus increased gene expression is required to obtain increased enzymatic activity, leading to amino acid biosynthesis in saline environments.



Although expression of *DhGDH1* in *S. cerevisiae* is influenced by Gln3p and members of the HAP complex, it is not salt-induced, suggesting that *D. hansenii* contains nitrogen- and carbon-driven regulatory networks similar to those found in *S. cerevisiae* (Coffman et al. 1995; Minehart and Magasanik 1991; Olesen et al. 1987; Stanbrough and Magasanik 1996; Blinder and Magasanik 1995) and specific regulatory networks that allow high gene expression under hypersaline conditions, which are not present in *S. cerevisiae*.

Conversely to what was observed for *DhGDH1*, *DhGLN1* expression was reduced in the presence of NaCl. It was shown that glutamine synthetase has high affinity for its substrates and a high capacity to synthesize glutamine (Woolfolk et al. 1966) and thus it could be speculated that, if glutamine synthetase from *D. hansenii* has similar kinetic properties to those found by Woolfolk et al. (1966), a reduction in the expression of its encoding gene would not affect glutamine production. Furthermore, low *DhGLN1* expression could result in decreased glutamine synthetase activity, thus preventing depletion of the glutamate pool (Nandinini et al. 2004).

The fact that *DhGDH1* and *DhGLN1* expression was oppositely regulated under hypersaline environments suggests that salt-dependent regulation could be achieved through the action of mechanisms which are independent of nitrogen-driven regulation, since it could be expected that nitrogen-mediated regulation results in increased levels of both *DhGDH1* and *DhGLN1*.

Although *D. hansenii* constitutes an interesting model to study stress response, only three genes (*DhGPD1*, *DhENA1*, *DhENA2*) have been studied which are specifically involved in this phenomenon and like their counterparts in *S. cerevisiae* have been found to be up-regulated under hyperosmotic conditions (Almagro et al. 2001; Nilsson and Adler 1990; Proft and Serrano 1999; Rep et al. 1999; Thomé and Trench 1999). These genes encode enzymes whose metabolic activity is clearly related to the mechanisms that have been proposed to withstand hypersaline environments. That *DhGDH1* and *DhGLN1* expression is salt-regulated represents a novel finding, since the expression of enzymes involved in central metabolism is not characteristic of the stress response (Gustin et al. 1998). This observation suggests that adaptation to continuous growth under hypersaline conditions probably relies on mechanisms adjusting the expression of genes pertaining to intermediate metabolism.

**Acknowledgements** This work was supported in part by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM; IN221103-2), by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; U40506Q) and by the CONACYT-CNR cooperation agreement. We acknowledge F. Bastarrachea and A. Peña for critical review of the manuscript. We are grateful to L. Ongay, G. Codiz and M. Mora (Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM) for DNA sequencing and synthesis of deoxyoligonucleotides. C.G. received a fellowship from the Consejo

Nacional de Ciencia y Tecnología (119373) and a grant from the Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM.

## References

- Alba-Lois L, Segal C, Rodarte B, Valdés-López V, DeLuna A, Cárdenas R (2004) NADP-glutamate dehydrogenase activity is increased under hyperosmotic conditions in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Curr Microbiol* 48:68–72
- Alder L, Gustafsson L (1980) Polyhydric alcohol production and intracellular aminoacid pool in relation to halotolerance of yeast *Debaryomyces hansenii*. *Arch Microbiol* 124:123–130
- Almagro A, Prista C, Benito B, Loureiro-Dias MC, Ramos J (2001) Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J Bacteriol* 183:3251–3255
- Avendaño A, DeLuna A, Olivera H, Valenzuela L, González A (1997) *GDH3* encodes a glutamate dehydrogenase isozyme a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 179:5594–5597
- Bansal PK, Mondal AK (2000) Yeast sequencing report. Isolation and sequence of the *HOG1* homologue from *Debaryomyces hansenii* by complementation of the *hog1Δ* strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16:81–88
- Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (2000) Yeasts: characteristics and identification, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge
- Benjamin PM, Wu JI, Mitchell AP, Magasanik B (1989) Three regulatory systems control expression of glutamine synthetase in *Saccharomyces cerevisiae* at the level of transcription. *Mol Gen Genet* 217:370–377
- Blinder D, Magasanik B (1995) Recognition of nitrogen-responsive upstream activation sequences of *Saccharomyces cerevisiae* by the product of *GLN3* gene. *J Bacteriol* 177:4190–4193
- Blomberg A, Adler L (1989) Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 171:1087–1092
- Botsford JL, Alvarez M, Hernandez R, Nichols R (1994) Accumulation of glutamate by *Salmonella typhimurium* in response to osmotic stress. *Appl Environ Microbiol* 60:2568–2574
- Coffman JA, Rai R, Cooper TG (1995) Genetic evidence for Gln3p-independent, nitrogen catabolite repression-sensitive gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 177:6910–6918
- Cogoni C, Valenzuela L, González-Halphen D, Olivera H, Macino G, Ballario P, González A (1995) *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. *J Bacteriol* 177:792–798
- DeLuna A, Avendaño A, Riego L, González A (2001) NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*: purification, kinetic properties and physiological roles. *J Biol Chem* 276:43775–43783
- Doherty D (1970) L-glutamate dehydrogenases (yeast). *Methods Enzymol* 17:850–856
- Forsburg SL, Guarente L (1989) Identification and characterization of *HAP4*: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes Dev* 8:1166–1178
- Gash AP, Werner-Washburne M, (2002) The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Funct Integr Genomics* 2:181–192
- Gonzalez A, Davila G, Calva E (1985) Cloning of a DNA sequence that complements glutamine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 36:123–129
- González-Hernández JC, Cárdenas-Monroy CA, Peña A (2004) Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* 21:403–412
- Govind NS, McNally KL, Trench RK (1992) Isolation and sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene from the euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii*. *Curr Genet* 22:191–195



- Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, Davenport K (1998) MAP-kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1264–1300
- Hohmann S (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeast. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:300–372
- Holzer H, Schneider S (1957) Anreicherung und Trennung einer DPN-spezifischen und einer TPN-spezifischen Glutaminsäure Dehydrogenase aus Hefe. *Biochem Z* 329:361–367
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153:163–168
- Lages F, Silva-Graca M, Lucas C (1999) Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeast: a study of 42 species. *Microbiology* 145:2577–2585
- Lépingle A, Casaregola S, Neuvéglise C, Bon E, Nguyen H, Artiguenave F, Wincker P, Gaillardin C (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 14. *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*. *FEBS Lett* 487:82–86
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Lucas C, Da Costa M, Van Uden N (1990) Osmoregulatory active sodium-glycerol co-transport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* 6:187–191
- Magasanik B (2003) Ammonia assimilation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 2:827–829
- Minehart PL, Magasanik B (1991) Sequence and expression of *GLN3*, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* 11:6216–6228
- Myers AM, Tzagaloff A, Kinney DM, Lusty CJ (1986) Yeast shuttle integrative vectors with multiple cloning sites suitable for constructions of *lacZ* fusions. *Gene* 45:299–310
- Nandineni MR, Laishram RS, Gowrishankar J (2004) Osmosensitivity associated with insertions in *argP* (*iciA*) or *glnE* in glutamate synthase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186:6391–6399
- Nilsson A, Adler L (1990) Purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Biochim Biophys Acta* 1034:180–185
- Norkrans B (1966) Studies on marine occurring yeasts; growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Arch Mikrobiol* 54:374–392
- Olesen J, Hahn S, Guarente L (1987) Yeast *HAP2* and *HAP3* activators both bind to the *CYCI* upstream activation site, UAS2, in an interdependent manner. *Cell* 51:953–961
- Perez-Castineira JR, Lopez-Marques RL, Villalba JM, Losada M, Serrano A (2002) Functional complementation of yeast cytosolic pyrophosphatase by bacterial and plant H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatases. *Proc Natl Acad Sci USA* 25:15914–15919
- Prior C, Potier S, Souciet JL, Sychrová H (1996) Characterization of the *NHA1* gene encoding a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 387:89–93
- Proft M, Serrano R (1999) Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol Cell Biol* 19:537–546
- Rep M, Albertyn J, Thevelein JM, Prior BA, Hohmann S (1999) Different signaling pathways contribute to the control of *GPD1* gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 145:715–727
- Riego L, Avendaño A, DeLuna A, Rodríguez E, González A (2002) *GDH1* expression is regulated by *GLN3*, *GCN4* and *HAP4* under respiratory growth. *Biochem Biophys Res Com* 293:79–85
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sherman D, Durrrens P, Beyne E, Nikolski M, Souciet JL (2004) Génolevures: comparative genomics and molecular evolution of hemiascomycetous yeasts. *Nucleic Acid Res* 32:D315–D318
- Sikorski RS, Hieter P (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122:19–27
- Stanbrough M, Magasanik B (1996) Two transcription factors, Gln3p and Nil1p, use the same GATAAG sites to activate the expression of *GAP1* of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 178:2465–2468
- Struhl K, Davis RW (1981) Transcription of the *HIS3* gene region in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 152:535–552
- Thomé PE, Trench RK (1999) Osmoregulation and the genetic induction of glycerol-3-phosphate dehydrogenase by NaCl in the euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii*. *Mar Biotechnol* 1:230–238
- Valenzuela L, Ballario P, Aranda C, Filetici P, González A (1998) Regulation of expression of *GLT1*, the gene encoding glutamate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 180:3533–3540
- Woolfolk CA, Shapiro B, Stadtman ER (1966) Regulation of glutamine synthetase. I Purification and properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 116:177–192