



**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DIFERENCIAL DE
Debaryomyces hansenii EN AMBIENTES HIPERSALINOS**

T E S I S

Que para obtener el grado académico de

Doctora en Ciencias

(Química Acuática)

P r e s e n t a

M. en C. Claudia Marissa Calderón Torres.

**Directores de tesis: Dra. Patricia Thomé Ortiz
Dr. Antonio Peña Díaz.**

**Comité tutorial: Dra. Patricia Thomé Ortiz
Dr. Antonio Peña Díaz
Dra. Alicia González Manjarrez.**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de la Unidad Académica de Puerto Morelos del ICMYL; en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, en el laboratorio a cargo del Dr. Antonio Peña Díaz y en el laboratorio a cargo de la Dra. Alicia González Manjarrez. En el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología-UNAM a cargo de la Dra. Alejandra Covarrubias y en el laboratorio de Microbiología y Genética Molecular del Instituto Nacional de la Investigación Agronómica (París-Grignon, Francia) con los Dres. Serge Casarégola y Cécile Neuvéglise.

JURADO DE EXAMEN

Presidente	Dr. Antonio Peña Díaz
Secretario	Dra. Patricia E. Thomé Ortiz
1er. Vocal	Dr. Manuel Uribe Alcocer
2o. Vocal	Dra. Alicia González Manjarrez
3er. Vocal	Dr. Carlos Rosas Vázquez
Suplente	Dra. Martha Eydi Calahorra Fuertes
Suplente	Dra. Gloria Yepiz Plascencia

....- ¡Capitán, es usted un enamorado del océano!

- Sí, sí lo soy. El mar lo es todo. Cubre siete décimas partes del globo terráqueo. Sus aguas son puras y saludables. Es una inmensidad donde el hombre jamás está solo, porque siente bullir la vida donde quiera. Es “el infinito viviente”, como lo ha dicho uno de sus poetas; es la inagotable despensa de la naturaleza. El mundo empezó en el mar y quizá acabe en él....

Julio Verne (1870).
Veinte Mil Leguas de Viaje Submarino.

A mi familia por ayudarme a realizar mis sueños. A mi madre Blanca Torres Robles por todo su amor, paciencia y por enseñarnos a salir adelante de las malas situaciones. A mis hermanos: Gloria por apoyarme y entenderme siempre, Erick por todo su cariño, alegría y ánimos con los que siempre me conforta, y Cecilia por toda su paciencia y calidez. A mis queridos sobrinos, la tierna Daniela, la risueña Fernanda, el atento Alejandro y la saltarina Karla.

AGRADECIMIENTOS

En particular le agradezco a la Dra. Patricia E. Thomé Ortiz la orientación, el apoyo, el interés y el ánimo que me brindó todo el tiempo para el desarrollo de esta tesis doctoral.

De forma muy especial le agradezco al Dr. Antonio Peña Díaz, todo su apoyo para que terminara esta tesis doctoral. Así como toda la bondad, orientación y buen ánimo que le caracteriza con el cual me enseñó que no sólo hay que adquirir calidad académica también hay que adquirir calidad humana.

Al Jurado de examen, Dr. Antonio Peña Díaz, Dra. Patricia E. Thomé Ortiz, Dr. Manuel Uribe Alcocer, Dra. Alicia González Manjarrez, Dr. Carlos Rosas Vázquez, Dra. Martha Eydi Calahorra Fuertes y Dra. Gloria Yepiz Plascencia por ayudarme con la revisión y corrección de esta tesis.

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, a La Unidad Académica de Puerto Morelos y Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por el apoyo académico y económico otorgado.

Al Instituto de Fisiología Celular por permitirme trabajar en sus instalaciones.

A la M. en C. Daniela Castro Granados, Dra. Gloria Martínez, Dra. Martha Calahorra, M. en C. Claudia Rodríguez y Dra. Natalia Copitin, su valiosa amistad y el apoyo que siempre me otorgaron durante mi estancia en el Instituto de Fisiología Celular-UNAM.

A mis queridos amigos, Claudia Rivera, Griselda Avila, Hugo Beltrán, Gloria Ramos, Cesar Meiners y Alejandro Zugasti. Por todo lo vivido en el surrealista Puerto Morelos.

También agradezco a Mary Carmén, Marci, Judith, Dolores, Sr. Ramos, Sr. Felipe, Sr. Amauri, Sr. Francisco, Sr. Eutimio de la UAPM-ICMyL por todo el cariño y atención con el que siempre me recibieron. A Pascal, María José, Lieve, Susza, Carolina, Hilde y Gus que con ellos mi estancia en París se hizo inolvidable. A Ángeluz Olvera e Ismael Madrigal por toda la calidez, atención y amistad con las que siempre me apoyaron en los tiempos más difíciles y duros de la tesis doctoral.

A Juan Manuel Barbosa Castillo, Ivett Rosas Arciniega por su asesoría y trabajo de computación. Gabriel Rosado Perera por su ayuda en el trabajo de computación en la UAPM-ICMyL.

Esta tesis se realizó gracias a la beca No. 113999 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES.....	7
Aspectos fisiológicos del transporte de cationes.....	9
Aspectos fisiológicos de la acumulación o síntesis de glicerol.	12
Aspectos moleculares de la halotolerancia en <i>D. hansenii</i>.....	13
3. OBJETIVOS.....	18
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
Condiciones de crecimiento de <i>D. hansenii</i> bajo estrés salino para la extracción del ARN_{Total}.....	19
<i>Condiciones de crecimiento de <i>D. hansenii</i> en ayuno por aminoácidos, estrés salino y el efecto combinado de ambos factores.....</i>	19
<i>Condiciones de crecimiento de la serie de tiempo para <i>D. hansenii</i> expuesta a choque salino por NaCl 2M.....</i>	20
Extracción del ARN_{Total}.....	20
Despliegue diferencial en el ARNm de <i>D. hansenii</i> sometida a estrés salino.....	21
<i>Extracción de las bandas de ADNc de los geles de poliacrilamida.....</i>	22
<i>Obtención de la secuencia completa de los genes correspondientes al ADNc.....</i>	23
<i>Purificación y separación del ADN cromosómico de <i>D. hansenii</i>.....</i>	25
<i>Análisis tipo ARN-ADN o del Northern blot.....</i>	26
Ensayo de la transformación de la mutante <i>ARO3/aro4Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> con el gen <i>ARO4</i> de <i>D. hansenii</i>.....	26
<i>Determinación fenotípica de las cepas silvestre, mutante nula y mutante complementada con DhARO4.....</i>	27
<i>Ensayo enzimático de la proteína Aro4 en la mutante transformada con DhARO4.....</i>	28
5. RESULTADOS.....	30

a) Extracción y purificación del ARN _{Total}	30
b) Transcripción inversa del ARN _{Total} , PCR del ADNc y electroforesis en gel de poliacrilamida para ADN.....	31
Verificación de los resultados del despliegue diferencial.....	35
a) Reamplificación de los fragmentos del ADNc.....	35
b) Hibridizaciones con ADN y ARN.....	35
Obtención de la secuencia completa de los genes con posible respuesta a estrés salino.....	39
a) Elaboración de una mini-biblioteca genómica de <i>D. hansenii</i>	39
b) Clonación de los fragmentos del ADN _{genómico}	41
c) Segunda estrategia para obtener la secuencia de los genes con posible respuesta a estrés salino.....	41
d) Verificación de los genes de respuesta a estrés salino mediante hibridización con el ADN cromosómico de <i>D. hansenii</i>	43
Verificación de la función de la proteína codificada por DhARO4.....	48
a) Complementación de la mutante de ARO4 de <i>S. cerevisiae</i> con ARO4 de <i>D. hansenii</i>	49
b) Subclonación de DhARO4 en el plásmido pYES.....	50
c) Determinación fenotípica de las cepas silvestre, mutante nula y mutante complementada con DhARO4.....	52
d) Ensayo enzimático de Aro4p.....	53
e) Respuesta de DhARO4 al estrés por falta de aminoácidos y por estrés salino.....	54
6. DISCUSIÓN.....	59
7. CONCLUSIONES.....	68
8. ANEXO 1.....	70
9. BIBLIOGRAFÍA.....	71

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo general de la respuesta de osmo-regulación de <i>S. cerevisiae</i>	9
Figura 2. Propuesta del modelo de osmo-regulación de <i>D. hansenii</i>	17
Figura 3. Diagrama de la técnica del Despliegue Diferencial de Liang y Pardee (1992).....	23
Figura 4. Eliminación de ADN contaminante en muestras de ARN.....	31
Figura 5. Productos de despliegue diferencial.....	33
Figura 6. Productos de despliegue diferencial en gel teñido con nitrato de plata.....	34
Figura 7. Reamplificación de las bandas del ADNc.....	36
Figura 8. Hibridización tipo Southern blot con fluoresceína.....	37
Figura 9. Hibridizaciones tipo Northern blot.....	38
Figura 10. ADN genómico digerido con diferentes enzimas de restricción.....	40
Figura 11. ADN genómico digerido con <i>Hpa</i> I - <i>Bam</i> H I y <i>Kpn</i> I.....	41
Figura 12. Amplificación por PCR de los genes de halo-respuesta.....	43
Figura 13. Extracción de cromosomas de <i>D. hansenii</i>	44
Figura 14. Posición de los genes de halo-respuesta en cromosomas de <i>D. hansenii</i>	45
Figura 15. Verificación del aumento del ARN _m de los genes de halo-respuesta en condiciones hiperosmóticas.....	46
Figura 16. Detección del gen <i>GAP1</i>	48
Figura 17. Clonación de ARO4 en el vector pCRII-TOPO.....	50
Figura 18. Subclonación de <i>DhARO4</i> en el plásmido pYES.....	51
Figura 19. Fenotipo de la expresión heteróloga de <i>DhARO</i> en <i>S. cerevisiae</i>	53
Figura 20. Northern blot del estrés salino y por falta de aminoácidos.....	57
Figura 21. Serie de tiempo para la evaluación del cambio del ARNm de <i>DhARO4</i> después de choque salino.....	58

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Secuencia y sitio de restricción de los oligonucleótidos específicos para la obtención de los genes de respuesta a estrés salino.....	24
Tabla II. Resultados de la comparación entre los fragmentos del ADNc y el banco de secuencias de <i>D. hansenii</i> del proyecto Génolevures.....	42
Tabla III. Valores de la actividad enzimática de la DAHP ^{Tir} sintetasa en la cepa silvestre y las mutantes <i>Aro4Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> transformadas con <i>DhARO4</i>	54
Tabla IV. Sitios tipo GCRES y CREs en el promotor de <i>DhARO4</i> de <i>D. hansenii</i> comparados contra los sitios GCRES funcionales en <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. albicans</i>	56
Tabla V. Valores de la actividad enzimática de la DAHP ^{Tir} sintetasa en la cepas silvestres de <i>S. cerevisiae</i> y <i>D. hansenii</i>	70

Resumen

La levadura marina *Debaryomyces hansenii*, ha sido objeto de intensos estudios para profundizar en el conocimiento de su halotolerancia elevada, y de los mecanismos celulares de su osmo-regulación en medios hipersalinos. En este trabajo se evaluó la expresión genética de *D. hansenii* cultivada en medios hipersalinos, por medio de la técnica del despliegue diferencial. Como respuesta al estrés salino se obtuvieron siete fragmentos de ADN_{complementario}. El análisis de la secuencia de cada fragmento en el programa BLASTX indicó que los fragmentos guardaban homología con *ARO4*, *CBK1*, *MER1* y *elf4-F* de *Saccharomyces cerevisiae*, con una GTP-hidrolasa1 de *Schizosaccharomyces pombe* y con *GAP1* de *Candida albicans*. La hibridación positiva de cinco de los genes con los cromosomas de *D. hansenii* ratificó su origen del ADN_{genómico} de *D. hansenii* y que son genes que presentan una sola copia en los cromosomas. La hibridación de cada gen con el ARN total de *D. hansenii*, cultivada tanto en ausencia como presencia de NaCl 2 M, demostró que durante el estrés salino aumenta la expresión de los genes *ARO4* y *elf4-F*.

La secuencia completa de los genes se obtuvo por comparación con el genoma de *D. hansenii* del banco de secuencias Génolevures. Se determinó la función de la proteína codificada por *DhARO4* en un ensayo de complementación de la función de Aro4p en la mutante nula *Aro4Δ* de *S. cerevisiae*, mediante: i) el crecimiento de la cepa silvestre y la mutante sin transformar y transformada con *DhARO4* en medio mínimo con fenilalanina y/o tirosina (5mM). La mutante transformada con *DhARO4* mostró el mismo crecimiento que la cepa silvestre; y ii) la medida de la actividad enzimática de Aro4p acoplada a la 3-deoxy-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintetasa inhibida por tirosina (DHAP^{Tyr}), en la mutante transformada con *DhARO4*, restablece el valor de 0.12 U·mg⁻¹ de DHAP^{Tyr} de la cepa silvestre de *S. cerevisiae*. Por lo tanto, *DhARO4* probablemente tiene la misma función de *ARO4* en *S. cerevisiae*.

En el ayuno por aminoácidos con 3AT (10 mM) y en el estrés por NaCl 2 M, el ARN_{mensajero} de *DhARO4* aumenta respectivamente 2.5 y 2 veces, en comparación con un control sin estrés. Al aplicar los dos tipos de estrés, la expresión de *DhARO4* aumentó 5 veces con respecto al mismo control, probablemente por una doble regulación por medio de los sitios GCRE y CRE que tiene en su región promotora. La evaluación de la expresión de *DhARO4* después de choque salino en una serie de tiempo de 27 horas demostró que *DhARO4* aumenta una vez que la célula reinicia su crecimiento exponencial, indicando que *DhARO4* no es un gen de respuesta inmediata al estrés salino, sino preferentemente del mantenimiento celular ante un estrés continuo por sodio.

Una evaluación de la actividad enzimática de la DHAP^{Tyr} sintetasa de las cepas silvestres de *S. cerevisiae* y *D. hansenii* en ausencia y presencia de NaCl 1 M, indicó que la actividad de *D. hansenii* es 5 veces mayor a la de *S. cerevisiae* en un medio sin sales y 10 veces mayor en presencia de NaCl 1 M. La expresión heteróloga de la enzima de *D. hansenii* en la mutante de *S. cerevisiae*, no muestra los altos niveles de actividad observados en *D. hansenii*, lo que sugiere que *D. hansenii* tiene elementos reguladores específicos de la especie.

1. INTRODUCCIÓN

Los océanos y los mares constituyen más del setenta por ciento de la superficie de la tierra, y en ellos se encuentran ambientes tan diversos como los de la provincia béntica (litoral, entre mareas, batial, abisal y hadal), o la pelágica (neríticas y oceánicas). No obstante su riqueza, el estudio y la comprensión de océanos y mares son insuficientes. Si bien en los últimos treinta años se ha dado mayor interés al estudio de océanos y mares, principalmente a través de disciplinas como la Oceanografía, que describe y propone modelos dinámicos que correlacionan los factores bióticos y abióticos del medio marino para explicar su funcionamiento; o como la Ecología, que estudia las relaciones entre los factores ambientales marinos y los organismos para determinar cómo logran adaptarse a su medio y lo transforman, y recientemente, la biotecnología que ha desarrollado productos a partir de organismos marinos para la solución de diversos problemas (enfermedades, desnutrición, contaminación), todavía hacen falta más investigaciones enfocadas a los ecosistemas marinos. Ni siquiera se ha concluido un aspecto tan importante como la determinación del número de especies que hay en el medio marino (biodiversidad marina) (Bull *et al.*, 2000), y aunque se han creado grupos de trabajo como el del Sistema Internacional del Censo de la vida marina (Census of Marine Life, COML), que emplea tecnología sofisticada como las imágenes satelitales y el análisis genético masivo, comparable sólo con el proyecto de la secuenciación del genoma humano (Azam y Worden, 2004), se estima que el número de especies marinas descritas es de aproximadamente 200,000 (<http://www.coml.org/baseline/annhigh05final.pdf>) mientras que el número real podría ser diez veces mayor.

En la disciplina de la ecología marina, el estudio de la fisiología de los organismos marinos es primordial para comprender su adaptación a los cambios en los factores del medio. Los factores ambientales más importantes son la salinidad, la alcalinidad y la temperatura del agua de mar, porque determinan la distribución espacio-temporal de los organismos y

evolutivamente diferencian el genotipo y fenotipo de los organismos marinos del de los organismos terrestres.

Son las zonas del litoral, de los estuarios y de la formación del hielo en el mar donde los cambios drásticos de salinidad y temperatura tienen un mayor efecto en la sobrevivencia y distribución de los organismos (Hyun *et al.*, 1999; Somero, 2002; revisión citada en Sanford, 2002; Thomas y Dieckmann, 2002; Kaartokallio *et al.*, 2005), debido a procesos de desecación e inundación por el ciclo de la marea, aporte de agua dulce, evaporación, formación de hielo, etc. En particular para hacer frente a los cambios de la salinidad del medio, los organismos marinos presentan diferentes respuestas; de las cuales al nivel celular, la principal es la osmo-regulación, que se define como el conjunto de mecanismos celulares que utiliza un organismo para regular su concentración de iones y evitar la pérdida o ganancia de líquidos (Csonka, 1989; Blomberg y Adler, 1992). Es precisamente a este nivel donde recientemente se ha aplicado un mayor esfuerzo con un resultado; sin embargo, aun son pocos los trabajos que han evaluado la expresión genética de los organismos marinos expuestos a cambios de salinidad (Luquet *et al.*, 2005).

En el presente trabajo se hace un estudio de la fisiología de la levadura marina *Debaryomyces hansenii*, cultivada en un medio hipersalino. En este estudio se mencionan los aspectos más relevantes de la estrategia de adaptación de *D. hansenii* a un medio de mayor salinidad y los resultados del estudio de la evaluación de la expresión genética de *D. hansenii* expuesta a estrés por sodio mediante la técnica de biología molecular denominada del despliegue diferencial.

D. hansenii es una levadura de origen marino, que ha colonizado diferentes ambientes hipersalinos, y puede vivir en suelos, alimentos, o en organismos vivos (Kreyer-van Rij, 1984; revisión citada en Corredor-Rodríguez, 2000). La relevancia fisiológica de *D. hansenii* reside en su tolerancia elevada a la presencia de sales en el medio, específicamente a concentraciones altas de sodio (Norkrans y Kylin, 1969; Adler *et al.*, 1985; Lucas *et al.*, 1990; Larsson *et al.*, 1990; Hernández-Saavedra *et al.*, 1995; Gupta, 1996), así como a valores elevados del pH

(Norkrans, 1968). La investigación en esta levadura se ha desarrollado primordialmente en los aspectos bioquímicos y genéticos de su crecimiento en alimentos salados y en ambientes hipersalinos.

D. hansenii está asociada a la producción de quesos, principalmente durante la etapa de la maduración (Welthagen y Viljoen, 1998; Bolumar *et al.*, 2005). En los estudios bioquímicos de *D. hansenii* creciendo en los quesos, se ha encontrado que lleva a cabo una asimilación de proteínas mediante proteólisis, (Kumura *et al.*, 2002) y que su papel principal en la maduración del queso es la modificación del valor del pH, y probablemente la coloración (Leclercq-Perlat *et al.*, 2004).

La investigación orientada a la fisiología de la osmo-regulación de *D. hansenii* cultivada en ambientes hipersalinos, se ha centrado en determinar los mecanismos celulares implicados en la respuesta al estrés salino. Se ha establecido que *D. hansenii* logra la homeostasis iónica mediante el transporte de cationes y la producción de glicerol como compuesto orgánico compatible (André *et al.*, 1988; Blomberg y Adler, 1992; Thomé y Trench, 1999). Adicionalmente se ha encontrado que el sodio no tiene efectos tóxicos celulares en *D. hansenii* (Prista *et al.*, 1997; Thomé *et al.*, 1998). Esto ha llevado a considerar a *D. hansenii* como una especie que acepta y acumula sodio en el interior (sodium-includer species) (Almagro *et al.*, 2001).

Aunque existen otros organismos que podrían utilizarse como modelos biológicos en el estudio de la osmo-regulación, se ha encontrado que *D. hansenii*, por sus características de halofilia o halotolerancia, es un modelo biológico adecuado para el estudio de este fenómeno.

Las comparaciones realizadas en *S. cerevisiae*, que ha sido utilizada como modelo para el estudio de la osmo-regulación, demuestran que ésta no tolera concentraciones elevadas de Na⁺ en el medio (Norkrans y Kylin, 1969; Prista *et al.* 1997), y que un medio con un valor de pH de 8, su crecimiento se inhibe completamente, mientras que *D. hansenii*, los parámetros de crecimiento como la concentración de células y la biomasa finales sólo presentan ligeras variaciones

(Prista *et al.* 1997). Recientemente Kogej *et al.* (2005) demostraron que *D. hansenii* en un medio de alta salinidad mantiene intracelularmente niveles elevados de sodio en comparación con el hongo halófilo *Hortea werneckii*, que puede crecer hasta niveles de saturación por sodio o con el hongo de halotolerancia elevada *Aureobasidium pullulans*, ambos aislados de ambientes hipersalinos (Gunde-Cimerman, 2000). Además, *D. hansenii* es uno de los microorganismos del cual se tiene mas información de los 500 hongos y levaduras marinas (Corredor-Rodríguez, 2000) que podrían ser utilizados en estudios de halotolerancia. Otra ventaja importante adicional es la información ya disponible de la secuencia completa de su genoma (Dujon *et al.*, 2004). En un análisis de las secuencias del genoma de *D. hansenii*, se encontró que posee 538 genes que codifican para proteínas de transporte en membrana mientras que *S. cerevisiae* tiene 508 (De Hertog *et al.*, 2006); también en *D. hansenii* se señala que 281 genes son acarreadores de iones, generalmente implicados en la respuesta de osmo-regulación durante un estrés osmótico. La capacidad de *D. hansenii* de mantener intracelularmente niveles elevados de sodio, y la posibilidad de realizar análisis como el anterior, motivan aún más el estudio de su fisiología. Si se verifica la función de la mayoría de estos genes de transporte de membranas, se podría tener un modelo más completo sobre sus mecanismos de osmo-regulación. Adicionalmente, esta información podría ser aplicada a la bioingeniería de organismos resistentes a un aumento en la salinidad del medio; para la agricultura, el mejoramiento de las especies de plantas cultivables es uno los objetivos más importantes, debido a la salinización gradual de las tierras de cultivo (Murgía *et al.*, 1996; Abebe *et al.*, 2003; Sanan-Mishra *et al.*, 2004). Así como para controlar la contaminación de productos preservados por salación (Prista *et al.*, 2005)

Hasta el momento, la información respecto a la osmo-regulación de *D. hansenii* indica que su estrategia de adaptación a ambientes hipersalinos es similar a la que presentan organismos halófilos como las arqueo-bacterias (Martin *et al.*, 1999) y las bacterias halófilas (Burg, 2003; Pflüger y Müller, 2004); es decir, una respuesta similar en cuanto a la acumulación y transporte de iones inorgánicos y la acumulación por transporte o síntesis de compuestos orgánicos

compatibles. Los estudios acerca de la presencia de enzimas tolerantes al sodio en *D. hansenii* son escasos; Alba-Lois *et al.* (2004) demostraron que la enzima glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente (*DhGdh1-NADP*) tiene una mayor actividad en las células cultivadas en presencia de sodio 1 M, en comparación con un control sin sales, pero no aumenta la concentración del glutamato, comportamiento contrario al aumento de glutamato que es utilizado por las bacterias como procedimiento osmo-protector. Al medir *in vitro* la actividad de la enzima se encontró que es sensible al sodio; los autores indicaron que el aumento en la actividad específica de la *DhGdh1p-NADP* sin incremento de glutamato probablemente es una estrategia específica de *D. hansenii* para contrarrestar los efectos de inhibición enzimática por sodio y demuestran que en la halotolerancia de *D. hansenii* participan proteínas integrantes de las vías del metabolismo central. Se observa que adicional a las principales respuestas de osmo-regulación encontradas en organismos halotolerantes o halófilos y demostradas recientemente en *D. hansenii*, es necesario estudiar cómo estas respuestas se conectan a diferentes niveles de organización celular; es decir, cómo se afecta el metabolismo central, la síntesis de lípidos y aminoácidos, las funciones de oxidoreducción, la respiración mitocondrial, tal como se ha observado en *S. cerevisiae* después de estrés osmótico (Rep *et al.*, 2000; Proft *et al.*, 2001). El presente trabajo apoya la propuesta de una interconexión de diferentes niveles de organización celular, al encontrar que en *D. hansenii* cultivada en un medio hipersalino aumenta la expresión del gen *DhARO4*. En *S. cerevisiae* se ha definido que Aro4p participa en la síntesis de aminoácidos aromáticos (Revisión citada en Sousa *et al.*, 2002). También se confirma la función de la enzima codificada por el gen *DhARO4*, mediante la complementación de la mutante nula para *Aro4* de *S. cerevisiae*. Finalmente se midió y comparó la actividad enzimática de Aro4p de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* cultivadas en presencia de NaCl 1 M, y se encontró que Aro4p de *D. hansenii* tiene una actividad enzimática 10 veces mayor a la de *S. cerevisiae*.

2. ANTECEDENTES

Entre los modelos de la respuesta celular de levaduras expuestas a diferentes tipos de estrés (térmico, limitación por nitrógeno, oxidativo, limitación por glucosa, osmótico, etc.) los basados en estudios realizados en *S. cerevisiae* son los más completos porque en ellos se han determinado el mayor número de genes que participan en su respuesta celular. En su aspecto de osmo-regulación (Fig 1), propone que: i) los genes *SLN1* y *SHO1* codifican las proteínas que registran los cambios osmóticos en el medio; ii) Los genes de proteínas del citoplasma que reciben y envían la señal del cambio osmótico *YPD1*, *SSK1*, *SSK2/22*, *STE11*, *PBS2*, *HOG1*, etc., conforman dos cascadas de activación o vías de señalización mediante la fosforilación de aminoácidos (generalmente serina, treonina o triptofano), y que ambas convergen en la fosforilación de la proteína Hog1p que una vez fosforilada es translocada del citoplasma hacia el núcleo, en donde funciona como regulador de los genes que se mencionan a continuación, iii) los genes regulados son *SKN7*, *SKO1*, *MSN2/MSN1*, *GCN4* y *SDG1* estos codifican las proteínas que directamente activan o reprimen la transcripción de los genes de respuesta a estrés, mediante su unión o separación de iv) secuencias específicas de ADN ubicadas en la región promotora de v) los genes de respuesta a estrés osmótico como *ENA1*, *ENA2*, *GPD1*, *GPP1*, *GDH1*, *HAL1*, *HAL2*, *HAP1*, *STL1*, *NHA1*, *GRE2* (Revisión citada en Hohmann, 2002). Aunque este modelo de osmo-regulación puede considerarse de respuesta única a un cambio de osmolaridad en el medio y en consecuencia la transcripción específica de genes implicados en la síntesis de glicerol y en el transporte de iones, se ha determinado que no es lineal y exclusivo del estrés osmótico ya que en estudios globales de la expresión de genes de *S. cerevisiae* (Rep *et al.*, 2000; Posas *et al.*, 2000; Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001; Yale y Bohnert, 2001) se ha determinado que algunos de los genes de respuesta a estrés osmótico son activados por más de un tipo de estrés y que no sólo está implicada la activación de los genes que participan en la síntesis de glicerol o en la homeostasis iónica, sino también son activados genes de la síntesis de lípidos y aminoácidos, de

funciones mitocondriales y de oxido-reducción, del metabolismo de fuentes de carbono y nitrógeno, es decir que el modelo de osmo-regulación no es aislado y con una respuesta única; en su lugar se considera un modelo interconectado y de respuesta diversa. En este modelo la diversificación se ubicaría en los genes que codifican proteínas que activan o reprimen la transcripción de los genes de respuesta como Sko1p y Gcn4p que pueden activar tanto genes de respuesta a estrés osmótico por Na⁺ como genes de respuesta a estrés por falta de aminoácidos (Pascual- Ahuir, 2001). En particular se ha determinado que Gcn4p es una proteína reguladora general ya que puede activar genes en otras condiciones de estrés como disminución de glucosa en el medio, crecimiento en etanol, presencia de rapamicina (Hinnebusch y Natarajan, 2002). Debido a que el modelo de osmo-regulación de *S. cerevisiae* es el más completo se utiliza como referencia para establecer modelos en otras levaduras. En *D. hansenii* esta comparación se aprecia desde los primeros estudios donde se determinó que tiene mayor halotolerancia que *S. cerevisiae*. A continuación se presentan los principales estudios fisiológicos y moleculares de la halotolerancia de *D. hansenii* comparada con *S. cerevisiae*.

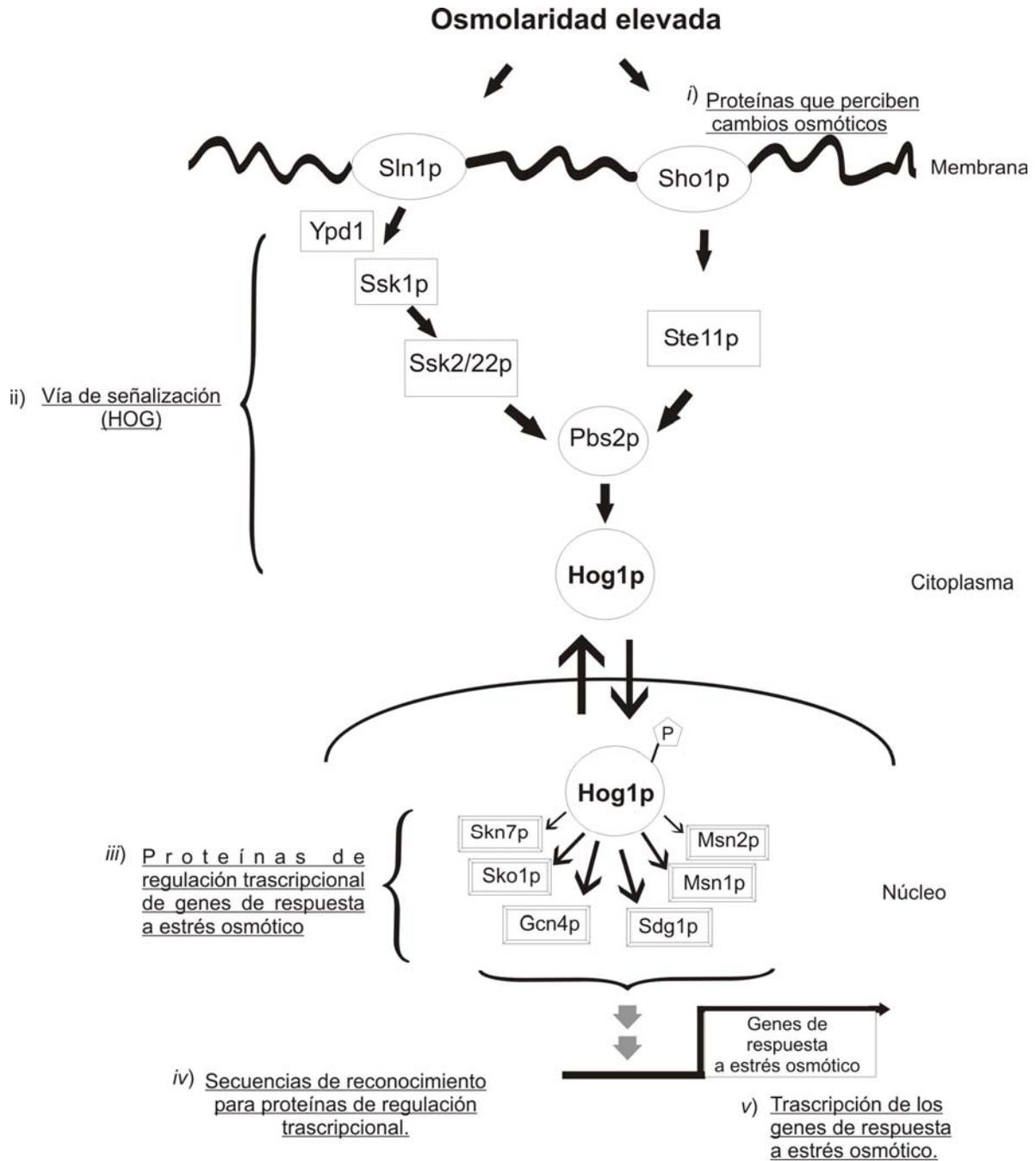


Figura 1. Modelo general de la respuesta de osmo-regulación de *Saccharomyces cerevisiae* (modificado a partir de Igual y Estruch, 2000; Hohmann *et al.*, 2002).

Aspectos fisiológicos del transporte de cationes.

En los trabajos de Norkrans (1966; 1968) y Norkrans y Kylin (1969) se describió por primera vez la halotolerancia de *D. hansenii*. Estos trabajos son

relevantes por la extensa evaluación de algunas de las características del crecimiento, respiración, fermentación, concentración celular y cinética de acumulación de Na^+ y K^+ de algunas levaduras y hongos marinos que crecen en un amplio margen de condiciones de salinidad, pH y temperatura. Encontraron que *D. hansenii* podía crecer hasta concentraciones máximas de NaCl 4.1 M, pH 8.5 y temperatura de 6 °C y que presentaba actividad respiratoria y de fermentación en presencia de NaCl 4.1 M. En la cinética de acumulación de K^+ , observaron que *D. hansenii* acumulaba potasio en presencia de concentraciones de sodio hasta 2.7 M, mientras que *S. cerevisiae* no acumulaba potasio a una concentración de NaCl 1.3 M en el medio. También observaron que *D. hansenii* expulsaba sodio aún en un medio con NaCl 2.7 M. Toda la evidencia anterior condujo a los autores a enunciar que uno de los principales mecanismos de halotolerancia en *D. hansenii* era la mayor acumulación de K^+ en presencia de sodio.

Durante la década posterior a los trabajos de Norkrans y Norkrans y Kylin, no se realizó investigación sobre el transporte de cationes que continuaran el estudio de la halotolerancia de *D. hansenii*. Fueron Hobot y Jennings en 1981, quienes nuevamente intentaron explicar la respuesta al crecimiento de *D. hansenii* en medios de pH alcalino y salinidad elevada. Estos autores propusieron la existencia de un transportador o bomba excluyente de sodio en *D. hansenii*. Burke y Jennings (1990) también evaluaron los efectos de NaCl sobre las características de crecimiento de *D. hansenii* en un medio con NaCl 1.5 M y pH 8. Estos autores plantearon que esta levadura osmo-regulaba por medio de dos mecanismos, uno de corto plazo que involucraba el transporte de sodio al interior, y otro para la eliminación del sodio de la célula, ambos asociados a la síntesis de glicerol. También sugirieron que en medios de baja salinidad los osmolitos principales eran potasio y glicerol y en medios de mayor salinidad eran sodio, glicerol y arabinitol. Sus estudios confirmaron que el crecimiento de esta levadura en medio salino es fisiológicamente diferente en condiciones alcalinas o ácidas, con un crecimiento óptimo en condiciones alcalinas.

Posteriormente, se definió que en *D. hansenii*, las concentraciones intracelulares de Na^+ aumentan al incrementar el sodio extracelular y alcanzan un

máximo en presencia de NaCl 2 M, mientras que el K^+ alcanza un máximo en presencia de NaCl 0.6 M y después disminuye ligeramente en presencia de NaCl 2 M (Neves *et al.*, 1997). Estos resultados, sumados a la observación de que la proporción de K^+ y Na^+ intracelular, se mantiene constante a pesar de los cambios en la salinidad del medio, llevaron a proponer que *D. hansenii* tiene un sistema de transporte eficiente capaz de mantener la homeostasis del cociente K^+/Na^+ . También se observó que *D. hansenii* era más tolerante al Na^+ y Li^+ que *S. cerevisiae*. Como no se observó toxicidad al Na^+ y K^+ en *D. hansenii*, se sugirió que en esta levadura no hay una toxicidad específica asociada al Na^+ , sólo el efecto osmótico, mientras que en *S. cerevisiae* el sodio es tóxico en concentraciones menores a las del K^+ . El mecanismo que propusieron Neves y colaboradores para explicar la toxicidad en *S. cerevisiae* fue la inhibición competitiva de la acumulación del K^+ , que lleva a la disminución del K^+ en la célula, y por lo tanto a un aumento en el nivel de sodio. Sugirieron también que la activación de la captación de K^+ por Na^+ , aun cuando la concentración de K^+ sea pequeña, confiere a *D. hansenii* una ventaja competitiva en medios naturales donde el K^+ es escaso y el Na^+ es abundante.

Thomé-Ortiz *et al.* (1998) también observaron que los iones de K^+ y Na^+ no son tóxicos para *D. hansenii*, pues se mantienen concentraciones elevadas de ambos cationes durante el crecimiento, sin alterarse los parámetros fisiológicos fundamentales, como crecimiento, respiración y fermentación. En células cultivadas en medios con una concentración menor de NaCl o KCl y luego transferidas a medios de concentración elevada del mismo catión o del catión opuesto, los autores observaron una acumulación inicial rápida de ambos cationes, seguida por una disminución en la misma, que no asociaron a un fenómeno pasivo o de intercambio de cationes en la pared celular. Consideraron que *D. hansenii* creciendo en NaCl o KCl 1 M, tiene un sistema de difusión que parece ser más específico para el Na^+ . Sus resultados demostraron que en *D. hansenii* existen diversos mecanismos de transporte, uno de los cuales es similar al de *S. cerevisiae*, como la ATPasa de protones, que disminuye los valores de ATP en presencia de potasio, que facilita el intercambio de protones y mantiene el

potencial de membrana. Después de añadir Na^+ y K^+ a pH de 8, observaron un aumento significativo del pH interno (pH_i), que podría explicarse por la existencia de un intercambiador K^+/H^+ para *D. hansenii*. Consideraron también factible un intercambiador muy rápido catión/catión, probablemente con afinidad baja, que podría catalizar el intercambio, particularmente a concentraciones elevadas de los cationes dentro y fuera de las células.

Aspectos fisiológicos de la acumulación o síntesis de glicerol.

Después de que se identificó el papel de los compuestos orgánicos que los organismos sintetizaban o acumulaban para lograr un equilibrio osmótico y que no afectaban otros procesos celulares y de que se les asignó el nombre de “compuestos compatibles” en la osmo-regulación (Brown y Simpson, 1972); se llevaron a cabo diversos trabajos para determinar los tipos de compuestos compatibles que presentaban diferentes organismos halotolerantes u osmotolerantes (revisión citada en Lang *et al.*, 1998; Yancey, 2005). Gustafsson y Norkrans (1976), determinaron que *D. hansenii*, al igual que otros organismos halotolerantes, sintetiza glicerol, y que su concentración interna aumentaba al aumentar la salinidad del cultivo. En un trabajo para determinar la regulación metabólica de la producción de glicerol, Adler *et al.* (1985) encontraron que la producción de glicerol en *D. hansenii* en condiciones de estrés salino era resultado de síntesis a partir de glucosa, vía la reducción de la dihidroxiacetona fosfato, catalizada por la enzima GPD-NADespecífica. En estudios similares se determinó que esta misma vía de síntesis de glicerol ocurre en *S. cerevisiae* y *Zygosaccharomyces rouxii*, (Blomberg y Adler, 1992).

André *et al.* (1988) también encontraron que al aumentar la salinidad del medio, aumenta la concentración intracelular de glicerol, pero no encontraron una concentración mínima de NaCl a partir de la cual se acumulara el glicerol. Estos autores propusieron que la acumulación de glicerol es una respuesta al estrés osmótico y no a la salinidad. Fue en el trabajo de Thomé y Trench (1999) donde se determinó que en *D. hansenii* el aumento de la enzima GPD-NAD se debía a

una inducción de síntesis o activación de la enzima por un choque con sodio, y que la máxima concentración de la enzima se alcanzaba cuando *D. hansenii* era expuesta a un medio con una concentración entre 2 y 3 M de NaCl. Estos autores también evaluaron la expresión del ARN_{mensajero} de la enzima GPD-NAD y la detección de la proteína mediante un análisis de inmunoblot en las condiciones de un choque salino de NaCl 1.5 M, encontrando que la proteína GPD-NAD era detectable en los primeros 30 minutos, precedida por la expresión del ARN_m-GPD en los primeros 15 min, y que este ARN_m aumentaba hasta los 45 min y se mantenía aún después de 3 horas de su inducción. Con la información anterior los autores indicaron que *D. hansenii* parece responder al choque osmótico por medio de la inducción rápida del ARN_m-GPD y la síntesis de la proteína GPD-NAD después de 15 minutos.

Aspectos moleculares de la halotolerancia en *D. hansenii*.

Respecto a los genes implicados en la regulación de la osmo-adaptación de *D. hansenii*, hasta el momento se ha logrado aislar y verificar la función de algunos genes, como *DhHOG1* (Bansal y Mondal, 2000). En *S. cerevisiae*, la vía de transmisión de señales denominada HOG (High Osmolarity Glycerol pathway) responde al aumento de la osmolaridad extracelular (Hohmann, 2002). En esta cascada de señalización, Hog1p es una de las cinasas que activa directamente los factores de transcripción de los genes de respuesta al estrés osmótico. En un trabajo más reciente sobre la activación de *DhHOG1*, Sharma *et al.* (2005), demostraron que no sólo se activa en condiciones de estrés osmótico, sino también por estrés oxidativo y radiación ultravioleta. Adicionalmente, estos autores determinaron que después de la activación de *DhHOG1* por estrés osmótico Hog1p permanece fosforilada en el citoplasma aún después de 15 horas, lo cual representa un problema si se considera que en *S. cerevisiae* después de choque osmótico Hog1p es fosforilada para su traslocación al núcleo, y después de la activación de diferentes genes se degrada rápidamente, ya que la permanencia de Hog1p es dañina para la célula (Hohmann, 2002). También se han aislado los

genes *DhENA1* y *DhENA2* (Almagro *et al.*, 2001), homólogos de las ATPasas de sodio y potasio *ENA1* y *ENA2* de *S. cerevisiae*. Aunque encontraron que *DhENA1* y *DhENA2* confieren a *D. hansenii* una mayor tolerancia a la presencia de sodio y potasio durante el crecimiento, sólo *DhENA1* tiene tolerancia al litio, mientras que en *S. cerevisiae* es *ScENA2* el que tiene un papel específico en la tolerancia a litio. Los autores postulan que en *D. hansenii* el papel de *DhENA1* y *DhENA2* es importante en la homeostasis osmótica intracelular y no en contrarrestar el efecto del sodio.

Aunque ya se había determinado que el glicerol es sintetizado por la GPD-NAD específica (Adler *et al.*, 1985), fue Thomé (2004) quien aisló el gen *DhGPD1*, que, al igual que el gen *ScGPD1*, participa en la producción de glicerol como un compuesto orgánico compatible de biomoléculas (Yancey, 2005).

Guerrero *et al.* (2005) analizaron la expresión de los genes *DhGDH1* y *DhGLN1* en diferentes concentraciones de sodio. En *S. cerevisiae*, los genes *GDH1* y *GLN1* participan en la síntesis de glutamato y glutamina. En primer lugar estos autores midieron la actividad enzimática de Gdh1p en las cepas silvestres de *D. hansenii* y *S. cerevisiae*, mutantes *gdh1Δ*, *gdh3Δ* de *S. cerevisiae* sin transformar y transformadas con *DhGDH1* y encontraron que en presencia de 0.6 M de NaCl la actividad enzimática de Gdh1p en las cepas silvestres es opuesta, en *D. hansenii* aumenta y en *S. cerevisiae* disminuye, mientras que en la mutante *gdh1Δ*, *gdh3Δ* de *S. cerevisiae* transformada con *DhGDH1* la actividad enzimática disminuye. Estos autores propusieron que la disminución de *DhGDH1* en *S. cerevisiae* es debida a sensibilidad al sodio. Aunado a lo anterior Guerrero y colaboradores encontraron que el transcripto de *DhGDH1* aumenta a partir de una concentración de sodio 0.6 M, y que la expresión incrementa hasta cinco veces con respecto a un control sin sales en presencia de sodio 2 M, mientras que en el gen *DhGLN1* disminuye en presencia de sodio 0.6 y 1 M. Los autores indicaron que este comportamiento opuesto sugiere que la regulación de estos genes en presencia de sodio es independiente de una regulación por nitrógeno, ya que en la regulación por nitrógeno aumentaría el nivel de expresión de ambos genes. Los autores consideraron que la disminución de la actividad enzimática de *DhGdh1p*

expresada en *S. cerevisiae* durante estrés salino, y el aumento en la expresión de *DhGDH1* al incrementar la concentración de NaCl en el medio refuerza la propuesta de Alba-Lois *et al.* (2004) de que *DhGDH1* es sensible al sodio y que el aumento en su expresión es necesaria para aumentar la actividad enzimática de *DhGdh1p* y disminuir el efecto de inhibición por sodio. Finalmente Guerrero *et al.* (2005) proponen que en la adaptación de *D. hansenii* a ambientes hipersalino participan mecanismos dependientes de sodio que llevan a la regulación de genes de las rutas metabólicas centrales.

Aggarwal *et al.* (2005) aislaron y la caracterización bioquímicamente al gen *DhHAL2*; gen presente en levaduras como *S. cerevisiae*, *Candida albicans* y *Schizosaccharomyces pombe*. *HAL2* de *S. cerevisiae* es un gen determinante de la disminución de la toxicidad por sodio (Todeschini *et al.*, 2006). Aggarwal y colaboradores determinaron que *DhHAL2* es el gen ortólogo funcional de *HAL2* de *S. cerevisiae* y que su expresión heteróloga aumenta la halotolerancia de *S. cerevisiae*. También observaron que la actividad de *Dhhal2p in vitro* no es sensible a sodio como en el caso de *S. cerevisiae*, pero sí es sensible al litio; los autores concluyeron que *Dhhal2p* es diferente de sus homólogos en otras levaduras porque es menos sensible al sodio y probablemente esta característica sea indispensable en organismos halotolerantes como *D. hansenii*.

Recientemente Velkova y Sychrova (2006) aislaron y purificaron el gen *DhNHA1* de dos cepas diferentes de *D. hansenii*, *NHA1* codifica para un transportador de Na⁺/H⁺ que durante estrés salino lleva a cabo la expulsión de sodio. Estos autores encontraron que la actividad de *Nha1p* de la cepa CBS767 es menor a la de la cepa CBS1793, pero que esta menor actividad en la cepa CBS767 no explica la mayor halotolerancia en la cepa CBS1793, en la cual, deben estar implicados otros transportadores de cationes que la hacen más eficiente en la expulsión de sodio. Al determinar la actividad de *DhNha1p* en la mutante *ena1-4Δ nha1Δ* de *S. cerevisiae*, encontraron que incrementaba su halotolerancia, y cuando el pH del medio fue de 4.5 observaron mayor expulsión del sodio intracelular mientras que a pH de 7 la eliminación de sodio es menor. Acorde con lo anterior, encontraron que la actividad de *DhNha1p* en *D. hansenii* se inhibe por

completo a pH de 8, y que la inhibición es revertida al añadir NH_4Cl . Con estos resultados Velkova y Sychrova (2006), propusieron que en *D. hansenii* la actividad de Nha1p es importante durante estrés salino en la expulsión de cationes y en la regulación intracelular de pH.

En términos generales se aprecia que la información sobre la osmo-regulación de *D. hansenii* todavía está en sus inicios, ya que aún se desconocen en detalle los diferentes procesos celulares que participan en el fenómeno de la osmo-regulación. Si esta información se coloca en un modelo de osmo-regulación como el de *S. cerevisiae* (Fig 1) se observa claramente que la información en *D. hansenii* es insuficiente para explicar su elevada halotolerancia (Fig 2). En resumen, se puede establecer: 1) que parte de la resistencia a sales de *D. hansenii* se debe: A la presencia de transportadores de cationes en la membrana plasmática (Thomé et al., 1998; Almagro et al., 2000), tal como se ha demostrado con los genes *DhENA1*, *DhENA2* y *DhNHA1* (Almagro et al., 2000; Velkova y Sicrova, 2006); 2) que el sodio no es tóxico para *D. hansenii* (Prista et al., 1997; Thomé et al., 1998) como quedo demostrado por estudios de la enzima codificada por *DhHAL2* (Aggarwal et al., 2005); 3) que una probable estrategia específica para evitar la toxicidad por sodio es el aumento de la expresión de genes y la actividad enzimática de algunas proteínas del metabolismo central como *DhGdh1p-NADP* (Alba-Lois et al., 2004; Guerrero et al., 2005); y 4) que *D. hansenii* sintetiza glicerol en respuesta al estrés salino (Gustafsson y Norkrans, 1976) mediante el incremento en la expresión de *GPD1* (Thomé y Trench, 1999). Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de realizar un mayor número de estudios enfocados a los aspectos moleculares y bioquímicos de los mecanismos de osmo-regulación en *D. hansenii*. A pesar del escenario anterior, se considera que existe la ventaja de tener como modelo de comparación al de *S. cerevisiae* que, aunque presenta una halotolerancia menor, ha sido ampliamente estudiada.

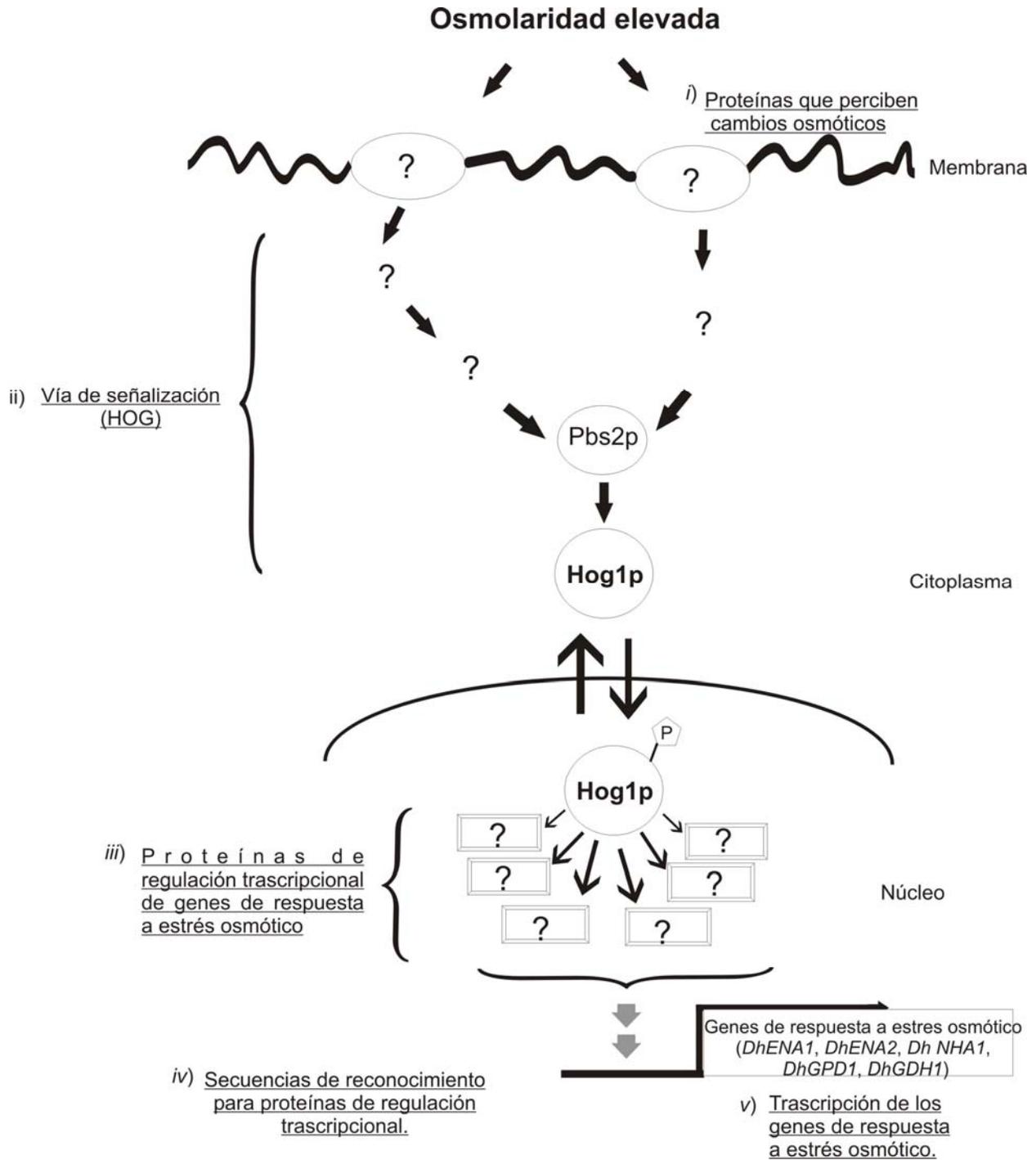


Figura 2. Propuesta del modelo de osmo-regulación de *D. hansenii* de acuerdo al modelo propuesto para *S. cerevisiae* (Igal y Estruch, 2000; Hohmann *et al.*, 2002).

3. OBJETIVOS

Objetivo general:

Identificar genes que se inducen en la levadura *D. hansenii*, en condiciones hiperosmóticas de crecimiento.

Objetivos particulares:

Conocer la forma en que el estrés salino modula la expresión de los genes involucrados en la tolerancia al estrés salino.

Aislar los transcritos que se inducen en condiciones hipersalinas.

Establecer la dependencia entre el aumento de los transcritos y la concentración de sales en el medio.

Obtener la secuencia del (los) gene(s) que corresponden al ADN_c de mayor expresión en las condiciones del estrés hipersalino.

Definir la función de las proteínas codificadas por los genes de respuesta al estrés hipersalino.

Verificar la función de las proteínas correspondientes a los genes inducidos mediante su expresión heteróloga en mutantes de los genes correspondientes de *S. cerevisiae*.

Conocer la forma en que el estrés salino afecta la actividad de las enzimas involucradas en la tolerancia al estrés salino tanto en *S. cerevisiae*, como en *D. hansenii*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

Cepas utilizadas.

Se utilizó la levadura *Debaryomyces hansenii* cepa Y7426 (CBS 767) de la colección del departamento de Agricultura de Peoria IL, EU; la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa silvestre y su mutante nula ARO3/aro4 Δ (BY4741 Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YBR249c::kanMX4) donada por el Dr. Jef. Boeke (Universidad Johns Hopkins, Baltimore USA) y la bacteria *Echerichia coli* DH α (sistema comercial Gibco).

Condiciones de crecimiento de *D. hansenii* bajo estrés salino, para la extracción del ARN_{Total}.

D. hansenii se cultivó en medio líquido YPM (p/v) [extracto de levadura 1%, peptona 2%, maltosa 2%] sin sales por 24 horas (precultivo). Este precultivo se empleó para inocular cultivos experimentales con YPM fresco sin sales (control), o bien adicionando el medio con NaCl a una concentración de 0.6 M y 2 M, con KCl a 2 M (estrés salino) y con sorbitol 2 M (estrés osmótico). Los cultivos se hicieron en matraces Erlenmeyer de 300 ml con 50 ml de medio y se incubaron a 30°C con agitación constante. Las células se colectaron en la fase de crecimiento exponencial intermedia ($1-5 \times 10^7$ cel \cdot ml⁻¹ ó 0.9 unidades de densidad óptica a 600 nm de longitud) para la extracción de ARN_{Total}.

Condiciones de crecimiento de *D. hansenii* en ayuno por aminoácidos, estrés salino y en el efecto combinado de ambos factores.

Para evaluar el efecto por limitación de aminoácidos en los cultivos de *D. hansenii*, se hicieron cuatro precultivos en medio mínimo (MM) sin aminoácidos y maltosa 2% (p/v) (MM-maltosa), se cultivaron 24 horas; los precultivos se centrifugaron y el paquete celular se transfirió a MM sin sales, y con NaCl 2 M, por duplicado. Los cultivos se mantuvieron en agitación a 30°C hasta la fase de crecimiento exponencial intermedia, en ese momento se centrifugaron y los paquetes celulares se transfirieron a MM-maltosa fresco sin adiciones (control),

con 3AT 10 mM (tratamiento de ayuno por aminoácidos), con NaCl 2M (estrés salino) o con 3AT 10 mM y NaCl 2M (efecto combinado de estrés salino y falta de aminoácidos). Después de una incubación de seis horas (tiempo estimado para activar la transcripción de los genes de síntesis de aminoácidos) los cultivos se centrifugaron y se extrajo el ARN_{Total} del paquete celular.

Condiciones de crecimiento de la serie de tiempo para D. hansenii expuesta a choque salino por NaCl 2M.

Para determinar el cambio en la expresión del ARN_{mensajero} (ARN_m) del gen *DhARO4* a partir del aumento de sales en el medio, *D. hansenii* se cultivó en medio YPM por 24 horas en agitación constante a 30°C. A partir de este precultivo, se utilizaron alícuotas para iniciar una curva de crecimiento con una densidad celular inicial de 1×10^5 cel. ml⁻¹ (que en *D. hansenii* equivale a 0.1 unidades de densidad óptica a 600 nm). Cada alícuota se centrifugó y cada paquete celular se colocó en medio YPM sin sales (control) y con NaCl 2M (choque salino). Inmediatamente se tomó una muestra (tiempo cero) de 50 ml del cultivo control y del choque por NaCl 2M para la extracción del ARN_{Total}. Después cada tres horas se tomaron muestras de 50 ml del cultivo con estrés salino por un período de 27 horas.

Extracción del ARN_{Total}

De las muestras antes descritas se extrajo el ARN_{Total} con el método modificado del fenol caliente de Schmitt, *et al.* (1990). Cada paquete celular se lavó con agua (tratada con DEPC) al 50 % de su peso; se centrifugó y resuspendió en 450 µl de buffer AE [Acetato de sodio (50 mM) pH 5.3 y EDTA (10 mM)]; la suspensión celular se transfirió a un tubo eppendorf previamente calentado a 65°C con 450 µl de fenol ácido, 5 µl de DEPC, 20 µl de SDS (10%) y perlas de vidrio. Las células se rompieron por agitación en vórtex por 30 seg y luego se incubaron a 65°C por un período de 10 min con agitación en el vórtex cada 5 minutos; después los tubos se enfriaron a -70°C por 5 min en un ultracongelador (Forma Scientific) y se centrifugaron a 10 000 x g por 5 min. La fase acuosa de cada

muestra se transfirió a un tubo eppendorf limpio y se añadieron 450 μ l de una mezcla de fenol ácido, cloroformo y alcohol isoamílico (proporción 25:24:1) que se agitó en el vórtex por al menos 20 seg y se centrifugó a 10 000 x g por 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf limpio y se repitió el paso anterior en presencia de fenol ácido-cloroformo (para eliminar la interfase de proteínas). Para recobrar el ARN_{Total} de cada fase acuosa se añadió 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 5.3) y 2 volúmenes de etanol (95%), después de centrifugar el paquete celular se resuspendió en agua (tratada con DEPC). Para eliminar el ADN que puede interferir con la técnica del despliegue diferencial, se hizo una digestión del ADN (remanente en la muestra del ARN_{Total}) con ADNasa (1 Unidad de ADNasa por cada μ g de ARN_{Total}) y después una precipitación selectiva del ARN_{ribosomal} y ARN_{mensajero} con LiCl 4 M. La calidad y la concentración del ARN se verificaron visualmente en una electroforesis de geles de agarosa y formaldehído para ARN (Rosen *et al.*, 1990).

Despliegue diferencial en el ARN_m de *D. hansenii* sometida a estrés salino.

La síntesis del ADN_{complementario} (ADN_c) a partir del ARN_{mensajero} se llevó a cabo de acuerdo con la técnica del despliegue diferencial (Fig 3) de Liang y Pardee (1992). El primer paso de esta técnica es la transcripción inversa del ARN_m a ADN_c, para esta reacción se utilizó 1 μ g de ARN_{Total}, una mezcla de tres oligonucleótidos dT₁₂ MN [MN = AA, CA y GA] y la enzima transcriptasa inversa (Superscript II, Life Technologies). En la segunda etapa de la técnica se sintetizó la segunda cadena del ADN_c y se enriqueció la concentración del ADN_c mediante una amplificación en cadena de la polimerasa (PCR), la amplificación por PCR se realizó en ausencia o presencia del oligonucleótido radioactivo ³⁵S-dATP con una alícuota de la reacción de la transcripción inversa y la mezcla de oligonucleótidos dT₁₂MN [MN = AA, CA y GA], dos oligonucleótidos arbitrarios y la enzima ADN Taq polimerasa (Gibco). La amplificación se llevo a cabo en las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización a 94°C por 1 min; 35 ciclos con una fase de desnaturalización a 94°C por 40 seg, de apareamiento de bases a 40° C

por 1 min y de elongación del producto a 72°C por 1 min 30 seg; y un ciclo final a 72°C por 5 min.

En la tercera etapa de la técnica para visualizar el ADN_c amplificado se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (6%) de condiciones desnaturalizantes para ADN (urea 7 M). Para visualizar las bandas del ADN_c radioactivas, el gel de poliacrilamida se expuso a una película sensible a radioactividad (Kodak) y se reveló por métodos fotográficos convencionales. En el caso del PCR no radioactivo, las bandas del ADN_c se visualizaron mediante una tinción del gel de poliacrilamida con nitrato de plata (Sigma).

Extracción de las bandas de ADN_c de los geles de poliacrilamida.

Las bandas del ADN_c con un aumento notorio en las condiciones de NaCl 2 M se recuperaron del gel de poliacrilamida mediante un procedimiento general de corte y elución que incluyó el corte de las bandas inmersas en la poliacrilamida, su ebullición en presencia del amortiguador TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM) y la precipitación del sobrenadante con acetato de sodio en presencia de glucógeno (10 mg·ml⁻¹). Después se llevó a cabo una amplificación del ADN_c mediante PCR; la reacción del PCR se realizó en las mismas condiciones de la técnica del DD. La visualización del ADN_c se hizo en geles de agarosa (1%) para ADN. Para conocer la secuencia del ADN_c amplificado, fue insertado en el vector de clonación pCRII-TOPO (sistema comercial de clonación, Qiagen) y se utilizaron los servicios de secuenciación de la unidad de Biología Molecular (IFC-UNAM).

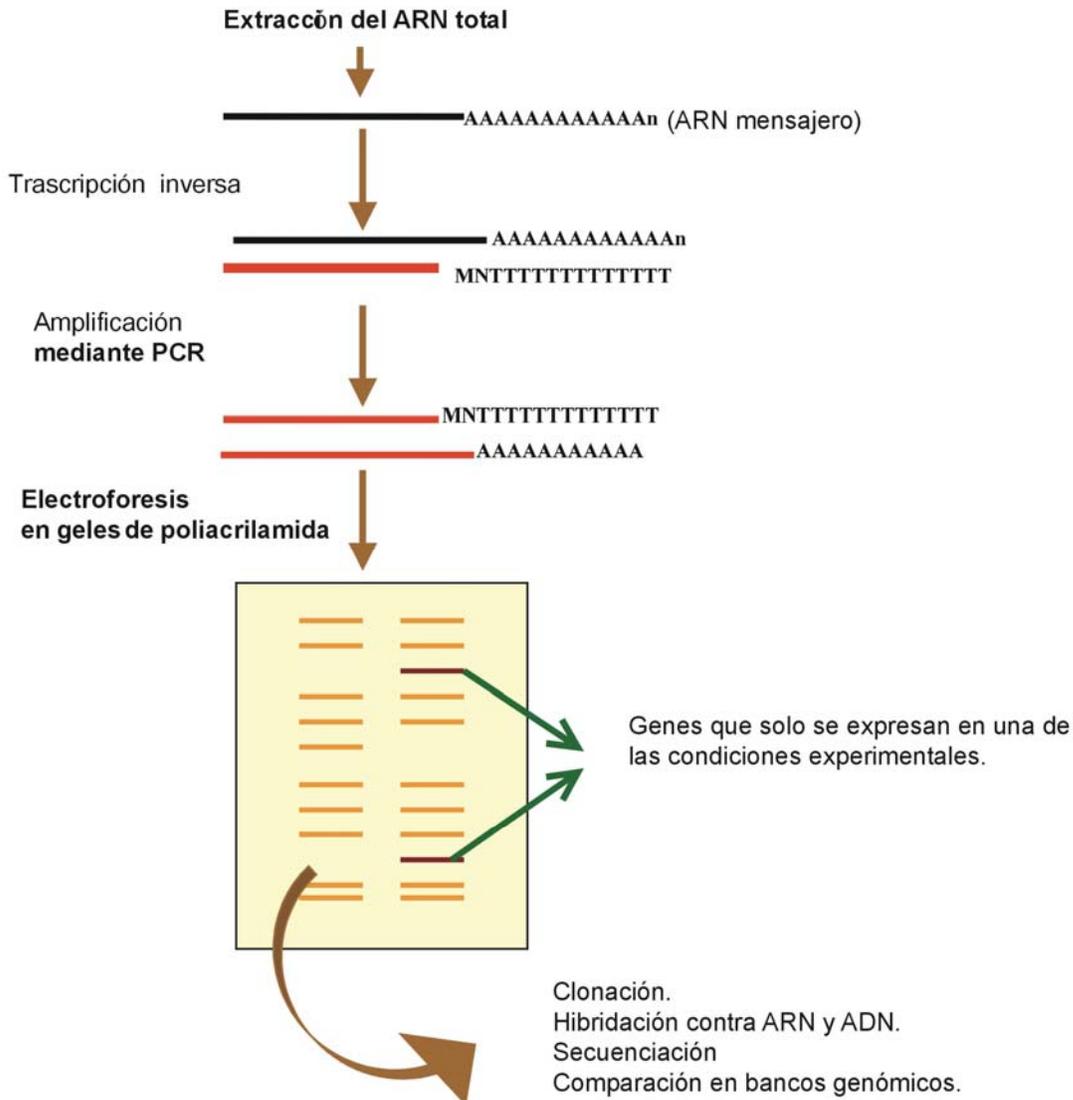


Figura 3. Diagrama de la técnica del Despliegue Diferencial de Liang y Pardee (1992).

Obtención de la secuencia completa de los genes correspondientes al ADN_c.

La secuencia de cada fragmento del ADN_c se comparó con el genoma de *D. hansenii* del banco de secuencias Génolevures (<http://cbi.labri.fr/Génolevures/blast>) y se encontró una secuencia con la que se apareaba cada fragmento del ADN_c. Para determinar la región codificante de cada

una de las secuencias encontradas se hizo un análisis con el programa ORF-Finder (buscador de marcos de lectura abiertos, <http://www.ncbi.nih.gov/gorf/gorf.html>). Para asignar la posible función celular de cada gen, se hizo un análisis de comparación de las secuencias de aminoácidos con el programa BLASTX (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>). Se realizó también un análisis de la región promotora de cada gen en el programa RSAT (Herramientas para el análisis de secuencias de regulación, <http://www.nih.nlm.nih.gov/rsat/tools>). Se diseñó un par de oligonucleótidos específicos para cada gen con un sitio de restricción para enzimas endonucleasas (Tabla I). La elección de las enzimas se determinó de acuerdo con los sitios de restricción del plásmido pBluescript, además de que no presentara un sitio interno de corte en cada gen. La obtención física de los genes se hizo mediante una amplificación por PCR del ADN_{genómico} de *D. hansenii*.

Tabla I. Secuencia y sitio de restricción de los oligonucleótidos específicos para la obtención de los genes de respuesta a estrés salino

Nombre	Secuencia
³⁵ S-1" (<i>GAP1</i>)	S 5'-CAA CCCGGG CGTTTGTGCGGAAGAATTT-3' A 5'-GGAGGATCCCGCGGCATCTAGGATCTTTA-3'
³⁵ S-2" (<i>ARO4</i>)	S 5'-ACT CCCGGG CCTAAAGATAAGGAATGATGC-3' A 5'-TCTATCGATTGAGCTTGGTAGGTTGTTACC-3'
³⁵ S-3" (<i>GTP-HI</i>)	S 5'- CCCGGG GCGTCAGAGTCCTGTTCTAA-3' A 5'-ATCGATGTGCATTGAACTTGGCTTCA-3'
"Ag-4" (<i>MER1</i>)	S 5'-TTT CCCGGG AGAGTCCGGGGGATTCAAGT-3' A 5'-TGAATCGATCCTATAGGCGTATGGGACGA-3'
"Ag-5" (<i>eIF4-4F</i>)	S 5'-CAT CCCGGG TACGGCCATCACACCTACAA-3' A 5'-AATATCGATCCCTGAGACACAGCTGGAAT-3'
"Ag-6" (<i>CBK 1</i>)	S 5'-GGA CCCGGG CCTTACCATGTCCAACA-3' A 5'-ATCGGATCCTGCGAAAACACTCATTACCC-3'

Secuencias sentido (S) y antisentido (A) de cada par de oligonucleótidos.

Sitios de restricción de enzimas endonucleasas, *Bam*H I subrayado, *Cla* I indicado en gris y *Sma* I indicado en negritas.

Purificación y separación del ADN cromosómico de D. hansenii.

Primero se hizo la extracción del ADN cromosómico de *D. hansenii*, de acuerdo con la técnica de cromosomas embebidos en agarosa para *Yarrowia lipolytica* (Casarégola *et al.*, 1997). Básicamente la técnica incluye una lisis celular por digestión enzimática con zimoliasa de células inmersas en agarosa y una electroforesis de campos pulsados en gel de agarosa para cromosomas. Para la lisis celular se colocó en un matraz Erlenmeyer de 50 ml una suspensión celular cuya densidad fue de 1.2×10^9 cel·ml⁻¹ y se añadió 15 µl·ml⁻¹ de zimoliasa 100 T (20 mg·ml⁻¹) y 20 µl·ml⁻¹ β-mercaptoetanol (concentración final de 0.28 M). La digestión se realizó a 37°C por 10 min, después se añadió agarosa (1.2%) de bajo punto de fusión a 50°C. La mezcla (suspensión celular-agarosa) se aplicó a un recipiente con pozos rectangulares [6 mm X 10 mm] que se enfriaron a 4°C por 20 minutos. Posteriormente los cubos con mezcla solidificada se colocaron en el amortiguador STE (Sorbitol 0.9 M, Tris/HCl 100 mM pH 8 y EDTA 100 mM pH 8), zimoliasa y β-mercaptoetanol por dos horas; luego se decantó el amortiguador STE y los cubos se dializaron con TE por 1 hora a 52°C y 1 hora a temperatura ambiente y se guardaron en TE a 4°C para su posterior utilización. En la electroforesis de campos pulsados se utilizó un aparato de electroforesis ortogonal modelo CHEF MAPPER (Bio Rad), un gel de agarosa al 1% (agarosa específica para electroforesis de campos pulsados) y como estándar del tamaño del ADN cromosómico se utilizó el patrón de *Hansenula wingei* (Bio Rad). Las electroforesis se hicieron a 12°C durante 40 horas. Después de cada electroforesis se transfirieron los cromosomas a membranas de nitrocelulosa. En la hibridización tipo Southern blot de cada membrana con los genes, se hizo un marcaje radioactivo de cada sonda con ³²P-dCTP mediante un etiquetado al azar (sistema comercial Rediprime II DNA, Amersham). La membrana radioactiva fue expuesta a película (Kodak) y se reveló con el procedimiento general de fotografía. Para ubicar la posición de cada gen en los cromosomas de *D. hansenii* se utilizó un densitometro digital modelo GS-690 (Bio Rad).

Análisis tipo ARN-ADN o del Northern blot.

Para verificar el aumento de los genes encontrados en condiciones de estrés salino, osmótico o por ayuno de aminoácidos, se realizaron hibridaciones tipo Northern blot. El ARN_{Total} extraído de las células de *D. hansenii* se separó por electroforesis en gel de agarosa y formaldehído, y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para su hibridación con cada uno de los genes marcados radioactivamente con ³²P-dCTP (sistema comercial de etiquetado al azar Rediprime II DNA, Amersham). La membrana radioactiva se expuso a una película (Kodak) y se reveló. Con el fin de comparar el aumento o disminución de cada uno de los genes en el ARN_{Total} de *D. hansenii* también se hicieron hibridaciones tipo Northern blot con el gen del ADN_{ribosomal} 17S de *D. hansenii*. Para lavar la sonda radioactiva de cada membrana se utilizó una disolución del detergente SDS 1% y SSC 0.1 %, se calentó en el horno de microondas hasta cuatro minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente; posteriormente se decantó la disolución de lavado y cada membrana fue re-hibridizada contra el gen del ADN_{ribosomal} 17S de *D. hansenii* marcado con ³²P-dCTP.

Ensayo de la transformación de la mutante *ARO3/aro4Δ* de *S. cerevisiae* con el gen *ARO4* de *D. hansenii* (*DhARO4*).

Para insertar la región codificante del gen *DhARO4* en un vector de clonación se escogió al vector pYES2 (Invitrogen), que incluye un sitio de clonación adyacente al promotor del gen de la galactosa; dicho promotor asegura que en un medio de cultivo cuya fuente de carbono sea la galactosa se induzca la transcripción del gen adyacente de interés. Primero se amplificó por PCR el gen *DhARO4* sin su región promotora a partir del ADN-genómico y dos oligonucleótidos específicos de secuencia: (oligo 5') 5'-CAAAGGATCCCAAATGAGTAAAACACCAA-3' y (oligo 3') 5'-AAATAACTATAGTTGGATTC-3' diseñados para obtener la región codificante del gen, y 500 pares de bases (pb) río abajo del codón de término, incluyendo dos sitios de corte para las enzimas de restricción *BamH* I y *EcoR* I. El producto de amplificación se clonó en el plásmido pCRII-TOPO (Invitrogen), y se transformaron

células competentes de *E. coli* (DH5 α) que se crecieron en medio Luria Bertani agar (2%) y ampicilina (200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 37°C por 24 horas. El crecimiento de colonias indicó la posibilidad de que incluyeran un inserto de 1600 pb. Para corroborar la presencia y el tamaño del inserto se hizo una extracción de plásmidos que se digirieron con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Kpn* I, y posteriormente se obtuvo la secuencia del plásmido (secuenciación realizada en la Unidad de Biología Molecular del IFC-UNAM). Una vez verificada la integración del gen *DhARO4* en el vector pCRII-TOPO, éste se liberó del vector de clonación y se subclonó en el vector pYES2. Para este propósito tanto el vector como el inserto se digirieron con las enzimas de restricción *BamH* I y *EcoR* I y se ligaron con la enzima T4 ADN-ligasa a 16°C por 21 horas. La reacción de ligación se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa (1%) para ADN con muestras al inicio y al final de la reacción. La inserción de la construcción pYES2-*DhARO4* en la mutante nula *ARO3/aro4 Δ* de *S. cerevisiae* se hizo con el método de transformación del acetato de litio (Gietz *et al.*, 1992). Las mutantes transformadas con *DhARO4* se cultivaron en medio mínimo sin aminoácidos (MM), con glucosa 2% (p/v) leucina (350 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), metionina e histidina (250 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), sin uracilo. El plásmido pYES tiene la secuencia del gen de la proteína que sintetiza uracilo, por lo que colonias presentes en medio sin uracilo indican una clonación positiva. Para confirmar que las colonias de *S. cerevisiae* obtenidas en el medio mínimo sin uracilo contenían al plásmido pYES-*DhARO4*, se obtuvo el ADN total (ADN_{genómico} de *S. cerevisiae* y ADN del plásmido) y se hizo una transformación bacteriana en *E. coli*. De las colonias de *E. coli* positivas se extrajo el ADN plasmídico, y con la digestión del plásmido con las enzimas *EcoR* I y *BamH* I se obtuvo un producto de 1600 pb que correspondía al gen *DhARO4*.

Determinación fenotípica de las cepas silvestre, mutante nula y mutante complementada con DhARO4.

La cepa silvestre de *S. cerevisiae* y sus cepas mutantes de *aro4 Δ* sin transformar y transformadas con pYES vacío o pYES-*DhARO4*, se cultivaron en medio MM con galactosa (2% p/v), leucina (350 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), metionina, histidina y

uracilo ($250 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) o sin uracilo en el caso de la cepa mutante de *aro4* Δ transformada con pYES-*DhARO4*. Los cultivos de cada cepa en la fase exponencial media (OD_{600} 0.6) se lavaron dos veces y se diluyeron en 1 ml de agua estéril. A partir de esta suspensión celular se hicieron 3 diluciones (1:1000, 1:10 000 y 1:100 000), se tomaron 10 μl de cada dilución y se aplicaron a cajas petri con MM galactosa (2%), agar (2%) uracilo ($200 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) fenilalanina (5 mM) con o sin tirosina (5 mM). Las cajas de Petri se incubaron a 30°C cuatro días, y para determinar y comparar el crecimiento de cada cepa se fotografiaron.

Ensayo enzimático de la proteína Aro4 en la mutante transformada con DhARO4.

El gen *ARO4* codifica para la enzima Aro4p una 3-deoxy-d-arabinoheptuloso-7-fosfato sintetasa inhibida por tirosina (DHAP^{Tyr}), que cataliza el primer paso en la síntesis de aminoácidos aromáticos (revisión citada en Sousa *et. al.*, 2002). Esta enzima convierte eritrosa-4-fosfato (en presencia de fosfoenol-piruvato) a 3-deoxy-d-arabinoheptuloso-7-fosfato, y este producto puede medirse por absorbancia a una longitud de onda de 549 nm (Springer *et al.*, 1997).

Las mutantes de *ARO3/aro4* Δ de *S. cerevisiae* transformadas con pYES2 vacío y pYES2-*DhARO4*, se cultivaron en MM con glucosa (2% p/v), fenilalanina (5mM), leucina ($350 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), metionina, histidina con o sin uracilo ($250 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) durante 24 horas en agitación constante a 30°C , después se transfirieron a MM fresco con galactosa (2% p/v) con una densidad optica de 0.4 - 0.5 a 600 nm y se dejaron incubar 4 horas en agitación constante a 30°C . Después de la inducción de *DhARO4* en medio mínimo con galactosa, las células se centrifugaron, se lavaron con amortiguador de fosfatos 10 mM pH 6.8 (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4), y se rompieron con perlas de vidrio en presencia del inhibidor de proteasas PMFS (0.1 mM). Para medir la actividad enzimática de DHAP^{Tyr} se siguió el procedimiento propuesto por Takahashi y Chan (1971) y las modificaciones de Subramaniam *et al.* (1998). El ensayo consistió en la incubación de 1 mg del extracto crudo de proteínas a 37°C por 20 min con fenilalanina 2 mM (para inhibir a la isoenzima DHAP^{Phe} codificada por *ARO3* que también cataliza el primer paso de la síntesis

de aminoácidos aromáticos), eritrosa-4-fosfato 3 mM, fosfoenol piruvato 1.5 mM y $MnSO_4$ (como cofactor de Aro4p). Luego la reacción se detuvo con ácido tricloroacético (20%), se centrifugó a 10 000 x g durante 3 min y al sobrenadante se le añadió $NaIO_4$ 25 mM en H_2SO_4 250 mM y se incubó a 37°C por 30 min. Posteriormente se le añadió Arsenito de sodio (2%) y al cambiar de color se le añadió ácido tio-barbitúrico 0.3% y se incubó en un baño en ebullición por 10 min. Para evitar la formación de turbidez de la solución se colocó en un baño maría a 60° C. Se midió la absorbancia de cada muestra a 549 nm en un espectrofotómetro modelo Beckman 6000. La actividad de la enzima se expresa en unidades de actividad (U), en donde una unidad (U 1) sintetiza 1 μ mol de producto por minuto. La actividad específica se indica como U·mg de proteína total⁻¹.

5. RESULTADOS

Análisis de la expresión diferencial en el ARN_m de *D. hansenii* expuesta a estrés hipersalino.

Con el fin de identificar los genes involucrados directa o indirectamente en el proceso de la osmo-regulación de *D. hansenii* expuesta a estrés hipersalino, se utilizó el despliegue diferencial del ADN_{complementario} (ADN_c), alternativa metodológica para el análisis de expresión genética. A continuación se presentan los resultados obtenidos en *D. hansenii*.

a) Extracción y purificación del ARN total. El ARN_{Total} extraído, si bien no presentó degradación (Fig 4A) debió ser purificado a fin de eliminar ADN contaminante (Fig 4A) mediante digestión con ADNasa, procedimiento común para eliminar el ADN_{genómico} en una muestra de ARN_{Total} (Liang y Pardee, 1995). En la técnica del Despliegue Diferencial el ADN_{genómico}, es uno de los principales factores por el que se pueden obtener resultados negativos o falsos positivos. La muestra digerida se purificó con un sistema comercial para ARN_{Total} (Qiagen). Sin embargo esto no fue suficiente, ya que después de visualizar el ARN_{Total} en geles de agarosa y formaldehído todavía se observaba contaminación por ADN_{genómico} de tamaño pequeño que en gel de agarosa se visualiza como un barrido entre las bandas del ARN_{ribosomal} y el ARN_{mensajero} (Fig 4B) que debe ser eliminado, porque una vez que el ARN_{mensajero} se transcribe a una primer cadena de ADN_c, no hay forma de diferenciar entre el ADN_c y el ADN_{genómico}, y ambos sirven como templado en la síntesis de la segunda cadena de ADN_c y su amplificación por PCR, el resultado es la presencia de copias del ADN_c denominado como falso positivo ya que no provienen de ARN_{mensajero}. Por ello se decidió llevar a cabo una purificación del ARN_{mensajero} con fenol caliente, seguida de una precipitación con LiCl 4 M, que se emplea para purificar ARN de peso molecular elevado (Sambrook, *et al.* 1989).

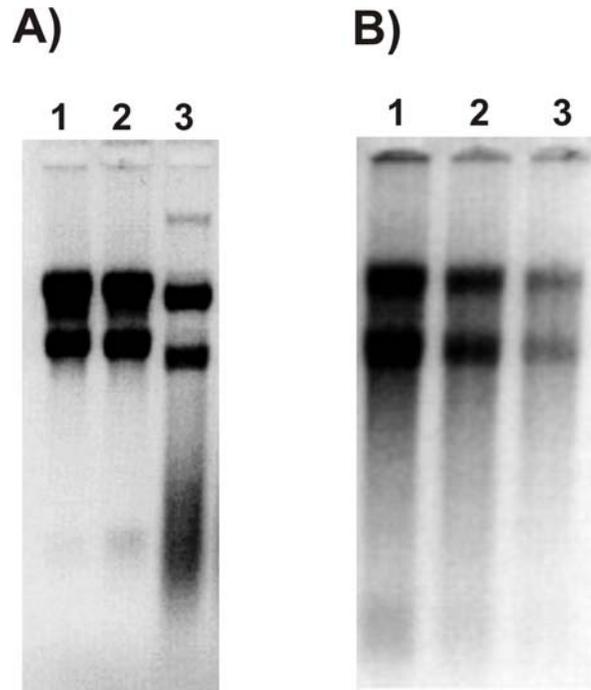


Figura 4. Eliminación de ADN contaminante en muestras de ARN. Gel de agarosa (1.2 %) y formaldehído, teñido con bromuro de etidio ($0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$) para ARN. Muestras del $\text{ARN}_{\text{Total}}$ extraído de *D. hansenii* crecida en medio YPM sin sales (1) con NaCl 0.6 M (2) o NaCl 2 M (3) antes y después de digerir con ADNasa (panel A y B respectivamente).

b) Transcripción inversa del $\text{ARN}_{\text{Total}}$, PCR del ADN_c y electroforésis en gel de poliacrilamida para ADN. La transcripción inversa se hizo en presencia de una mezcla de tres oligonucleótidos dT_{12} [AA, CA GA] para el anclaje del ARN_m . Después de obtener la primera copia del ADN_c , su amplificación y la síntesis de la cadena complementaria se hicieron con un PCR radioactivo en el laboratorio de Biología Molecular de Plantas y Levaduras (IBT-UNAM) de la Dra. Alejandra Covarrubias. En el PCR se utilizó el nucleótido d-ATP 35 [S], los oligonucleótidos dT_{12}MN [MN = AA, CA GA] y un cebador arbitrario, de acuerdo con el método de Liang y Pardee (1992). Para evaluar y visualizar los resultados obtenidos con la amplificación mediante PCR se llevó a cabo una electroforésis en gel de poliacrilamida de condiciones desnaturalizantes para ADN (TBE-Urea) y después

de exponer el gel de poliacrilamida a una película de rayos X (BioMax, KODAK) durante 36 horas, se observaron alrededor de treinta bandas del ADN_c en las muestras de los tratamientos con NaCl 0.6 y 2 M; en los otros tratamientos sólo se observó un barrido (Fig 5, carriles 1-2, 7-8 y 9-10), debido probablemente a una contaminación persistente de ADN_{genómico} o la degradación del ARN durante la transcripción inversa. La observación más importante fue el aumento de tres bandas en el tratamiento con NaCl 2 M, que se consideró como una respuesta específica al estrés osmótico en *D. hansenii*.

Una de las conclusiones más importantes de este experimento fue determinar los factores que redujeron el éxito en la aplicación de la técnica del despliegue diferencial (DD) en *D. hansenii*; entre los factores principales está la contaminación por el ADN_{genómico} y/o la degradación del ARN_r y ARN_m después de la re-extracción con fenol y precipitación con LiCl.

Considerando que el ADN_c obtenido en las condiciones de NaCl 0.6 y 2 M no se degradaba durante el DD se decidió establecer como condición control del DD al tratamiento con NaCl 0.6 M. Neves *et al.* (1997) y González-Hernández *et al.* (2004) encontraron que la presencia de NaCl 0.6 M en el medio de cultivo no tiene efecto sobre los parámetros de crecimiento de *D. hansenii*, por lo que determinaron que el crecimiento en presencia de NaCl 0.6 M no es una condición de estrés para *D. hansenii*. Se volvió a amplificar el ADN_c de los tratamientos NaCl 0.6 y 2 M; la amplificación por PCR no incluyó el marcaje radioactivo, por lo que después de la electroforesis en gel de poliacrilamida se llevó a cabo una tinción del gel con nitrato plata. Con este procedimiento se pudo apreciar un mayor número de bandas del ADN_{complementario} en las condiciones de NaCl 0.6 y 2 M (Fig 6).

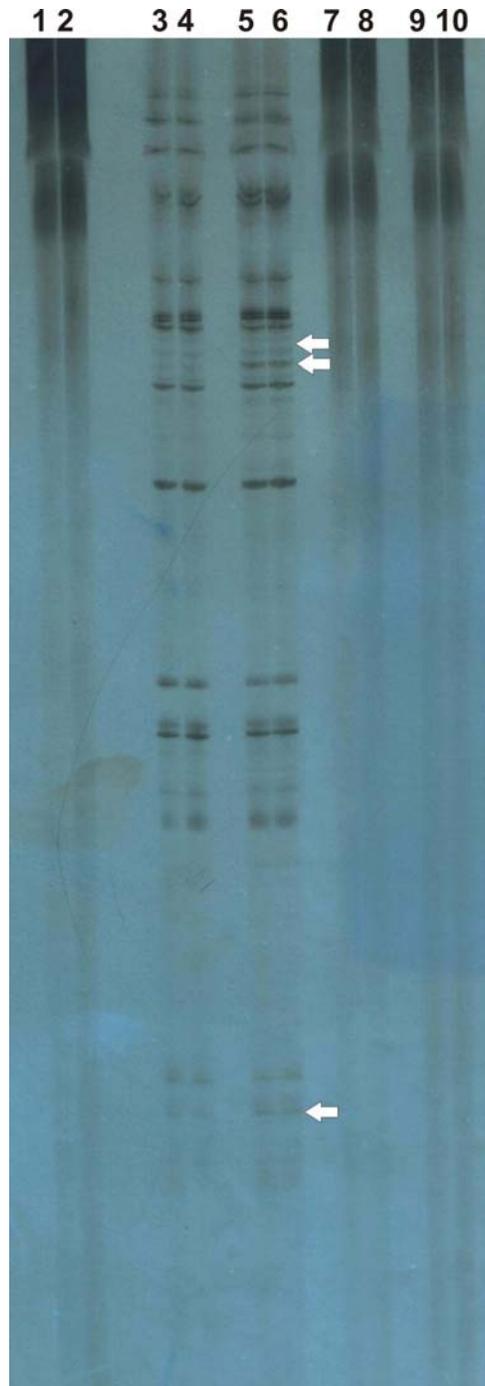


Figura 5. Productos de despliegue diferencial. Radiograma de un gel de poliacrilamida (6 %) y TBE-UREA para ADN, donde el ADN_c fue marcado con ³⁵S dCTP, de células de *D. hansenii* creciendo en medio YPM, control sin sales (1), estrés salino por NaCl 0.6 M (3), NaCl 2 M (5) y KCl 2 M (7) y estrés osmótico por sorbitol 2 M (9). Los carriles con número par son repeticiones del control y de cada tratamiento. El aumento del ADN_c en las condiciones del estrés por NaCl 2M se resalta con una flecha.

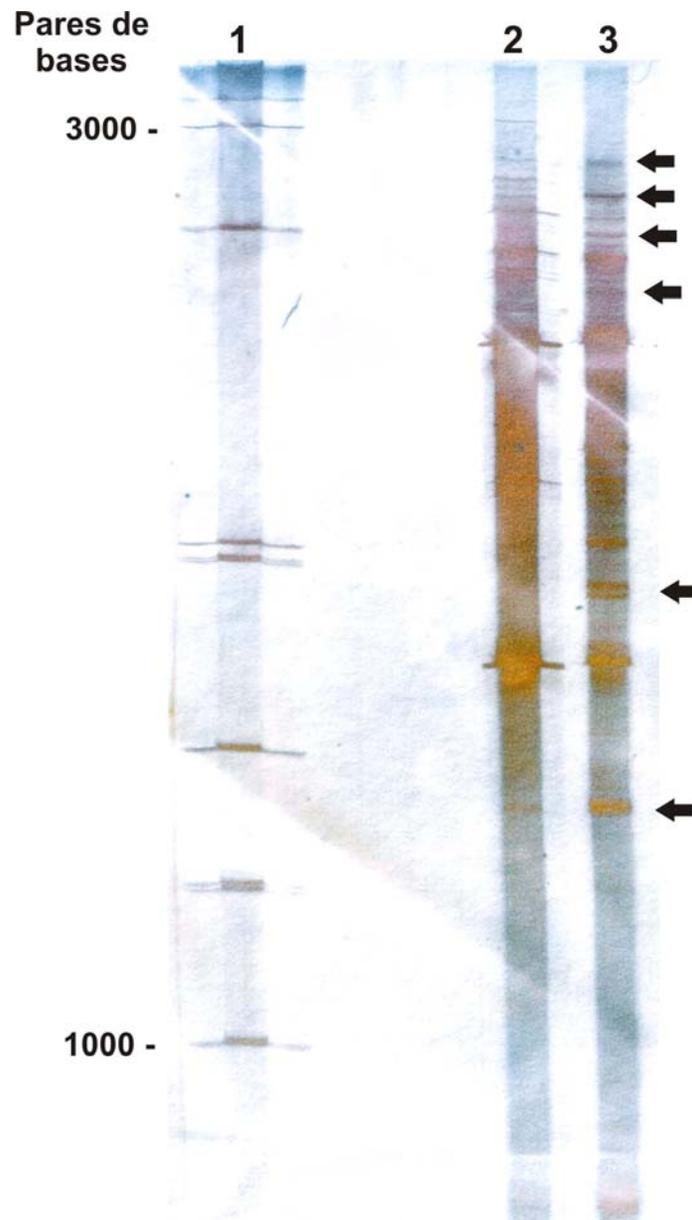


Figura 6. Productos de despliegue diferencial en gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata. Fotografía de un gel de poliacrilamida (6%), TBE-Urea para ADN, teñido con nitrato de plata, de células de *D. hansenii* cultivadas en medio YPM, control con NaCl 0.6 M (2) y estrés salino con NaCl 2 M (3). Estándar del ADN en pares de bases (1). Los aumentos en la concentración de los transcritos en las condiciones de NaCl 2M se indican con una flecha.

Verificación de los resultados del despliegue diferencial.

a) Reamplificación de los fragmentos del ADN_c. De los geles con radioactividad o teñidos con nitrato de plata se extrajeron siete bandas de ADN_c que presentaron un aumento de concentración en el tratamiento con NaCl 2 M respecto al control con NaCl 0.6 M. El ADN_c se recuperó de acuerdo con el método de elución y precipitación de Liang y Pardee (1997). Posteriormente las bandas se reamplificaron mediante una reacción de PCR bajo las mismas condiciones empleadas en el despliegue diferencial (Fig 7). Las bandas del ADN_c recuperadas de cada gel se insertaron en el plásmido pCRII-TOPO (sistema comercial específico para productos de PCR), de cada clonación se hizo una transformación bacteriana en *E. coli* para su propagación y posterior secuenciación (Unidad de Biología Molecular, IFC-UNAM).

b) Hibridizaciones con ADN y ARN. Para corroborar que los fragmentos del ADN_c pertenecen al ADN_{genómico} de *D. hansenii* se hicieron hibridizaciones tipo Southern blot y Northern blot. En los dos tipos de hibridización los fragmentos del ADN_c se marcaron con fluoresceína, de acuerdo con el protocolo del sistema comercial ECL (Amersham International), y se hibridizaron con el ADN_{genómico} o el ARN_{Total} de *D. hansenii* expuesta a NaCl 0.6 y 2 M. Con el sistema de marcado de fluoresceína sólo se obtuvieron resultados en algunas de las hibridizaciones tipo Southern blot (Fig. 8), en las hibridizaciones tipo Northern blot no se observó ninguna banda. Dado que con el sistema enzimático se tuvieron resultados insuficientes, se optó por la hibridización con marcaje radioactivo, que se realizó en el Departamento de Genética Molecular (IFC-UNAM) en el laboratorio de la Dra. González Manjarrez.

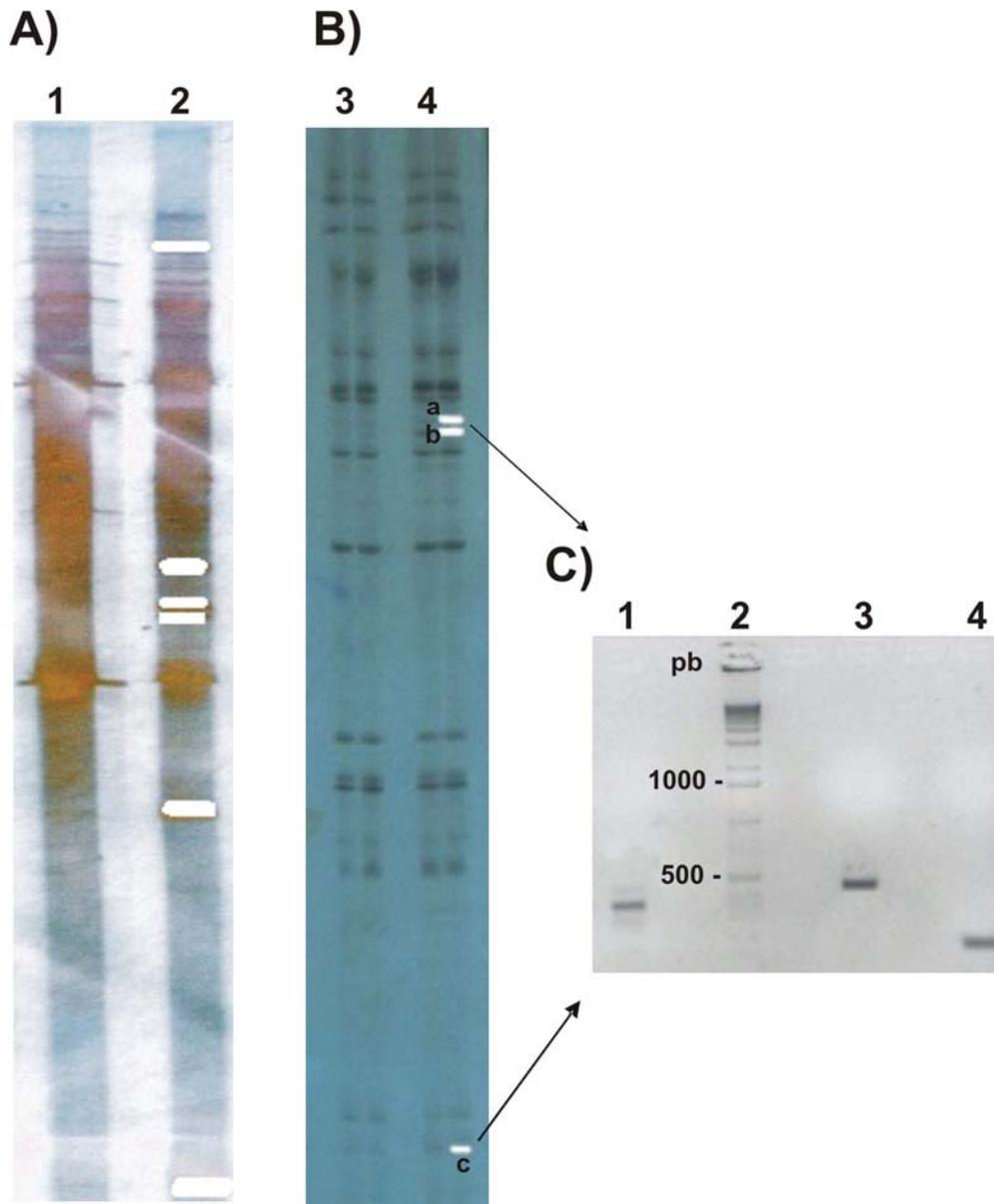


Figura 7. Reamplificación de las bandas del ADN_c. A) Fotografía del Gel de poliacrilamida para ADN, donde el ADN_c fue teñido con nitrato de plata, B) radiograma de un gel de poliacrilamida para ADN, donde el ADN_c fue marcado con ³⁵S dCTP, en ambos gels se cortaron las bandas del ADN_c que solo aumentaron en presencia de NaCl 2 M para su reamplificación por PCR. C) Gel de agarosa (1.5 %) para ADN teñido con bromuro de etidio (100 µg ml⁻¹) que muestra las bandas del ADN_c reamplificadas mediante PCR, los carriles 1, 3 y 4 corresponden a la reamplificación de las bandas b, a y c en el gel del panel B. Carril 2 estándar del tamaño de ADN en pares de bases.



Figura 8. Hibridización tipo Southern blot con fluoresceína. Radiograma de un gel de agarosa para ADN, que muestra la hibridización de la sonda del ADN_c ³⁵S-3 marcada con fluoresceína contra el ADN_{genómico} de *D. hansenii*.

Durante la estancia sólo se pudo llevar a cabo el ensayo Northern blot radioactivo para tres de los fragmentos del ADN_c; se encontró que sólo la expresión de dos de los fragmentos de ADN_c aumentó en el tratamiento con NaCl 2 M respecto al control con NaCl 0.6 M. (Fig 9), el fragmento del ADN_c cuya expresión no cambio en presencia de NaCl 2M se consideró como un resultado falso positivo del DD. El fragmento del ADN_c con el mayor aumento de expresión fue el ADN_c denominado ³⁵S-2; del que se consideró se debería obtener la secuencia completa en la estancia programada en el laboratorio de microbiología y genética molecular del Instituto Nacional de la Investigación Agronómica (París-Grignon, Francia).

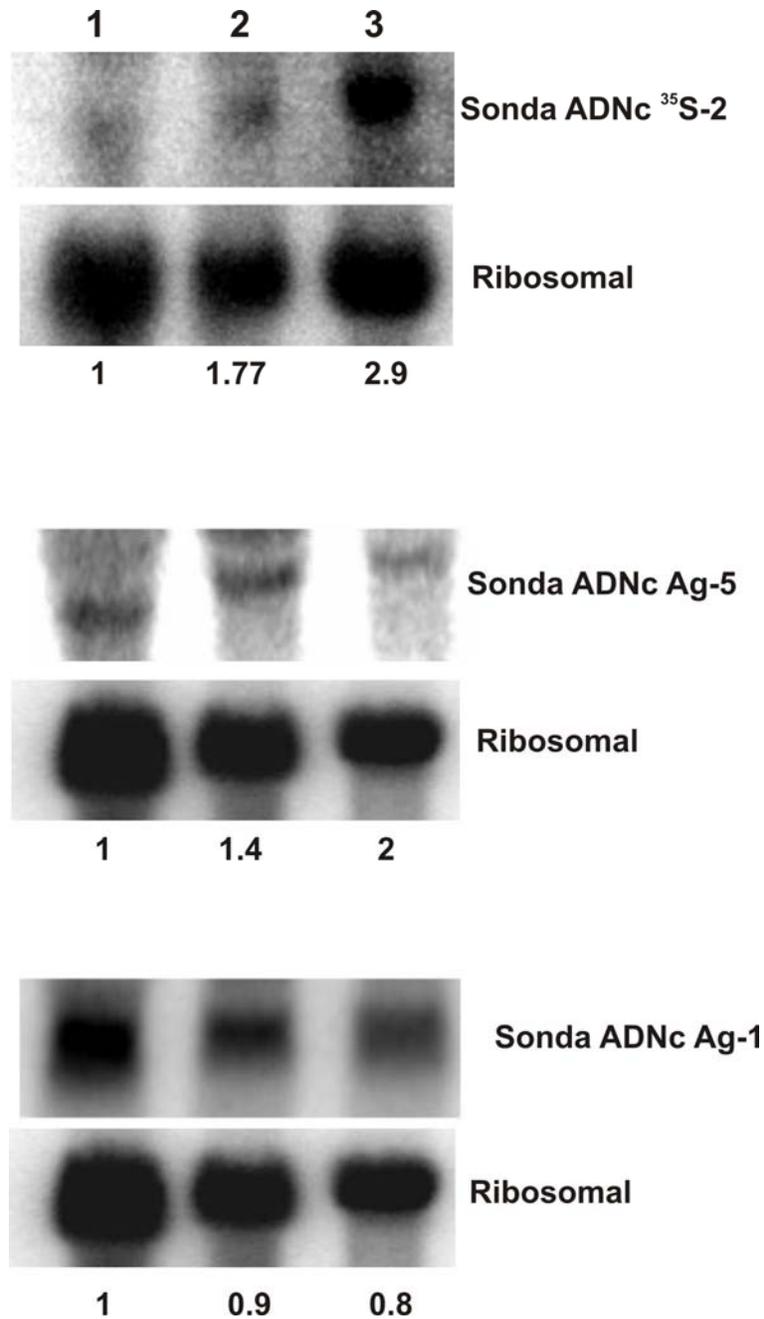


Figura 9. Hibridizaciones tipo Northern blot. Radiogramas de los geles de agarosa y formaldehído para ARN, que muestran tres hibridizaciones del ADN_c contra el ARN_{Total} de *D. hansenii* cultivado en ausencia de sales (1), o presencia de NaCl 0.6 M (2) y NaCl 2M (3). El gen del ARN_{ribosomal} 17S de *D. hansenii* (panel inferior), se utilizó como control de carga de ARN_{Total} en cada muestra y para validar el aumento del ARN_{mensajero} de cada gen. Los números indican el aumento del transcripto del gen con respecto al control.

Obtención de la secuencia completa de los genes con posible respuesta a estrés salino.

La secuencia completa de los genes correspondientes a los fragmentos del ADN_c, se obtuvo en el laboratorio de microbiología y genética molecular del Instituto Nacional de la Investigación Agronómica (París-Grignon, Francia). Laboratorio que forma parte del consorcio que dirigió el proyecto de la secuenciación de trece levaduras de interés biotecnológico (denominado Génolevures), entre las cuales está incluida la especie *D. hansenii*. Inicialmente se consideró la obtención de los genes de respuesta a estrés hiper-salino empleando la biblioteca parcial de *D. hansenii* (parcial hasta 2002) del proyecto Génolevures; sin embargo, con esta biblioteca sólo se tendría cubierto del 0.3 a 0.6% del genoma de *D. hansenii*, por lo que se decidió preparar una mini-biblioteca genómica para los genes de interés.

a) Elaboración de una mini-biblioteca genómica de *D. hansenii*. Para la preparación de la mini-biblioteca genómica primero se hicieron ensayos de restricción del ADN de *D. hansenii* con diferentes pares de endonucleasas (Fig 10), y se definió que las enzimas *Hpa* I y *Bam*H I producían fragmentos de ADN con un tamaño aproximado de 7×10^3 pares de bases (Fig 10), que se consideraron como satisfactorias para obtener la secuencia completa del gen, incluyendo mil pares de bases anteriores y posteriores a la región que codifica una proteína. Se digirió una muestra del ADN_{genómico} de *D. hansenii* con estas enzimas, separando los productos de la doble digestión en una electroforesis en gel de agarosa; del gel se extrajeron los segmentos correspondientes al ADN con un tamaño en pares de bases de 7×10^3 (Fig 11).

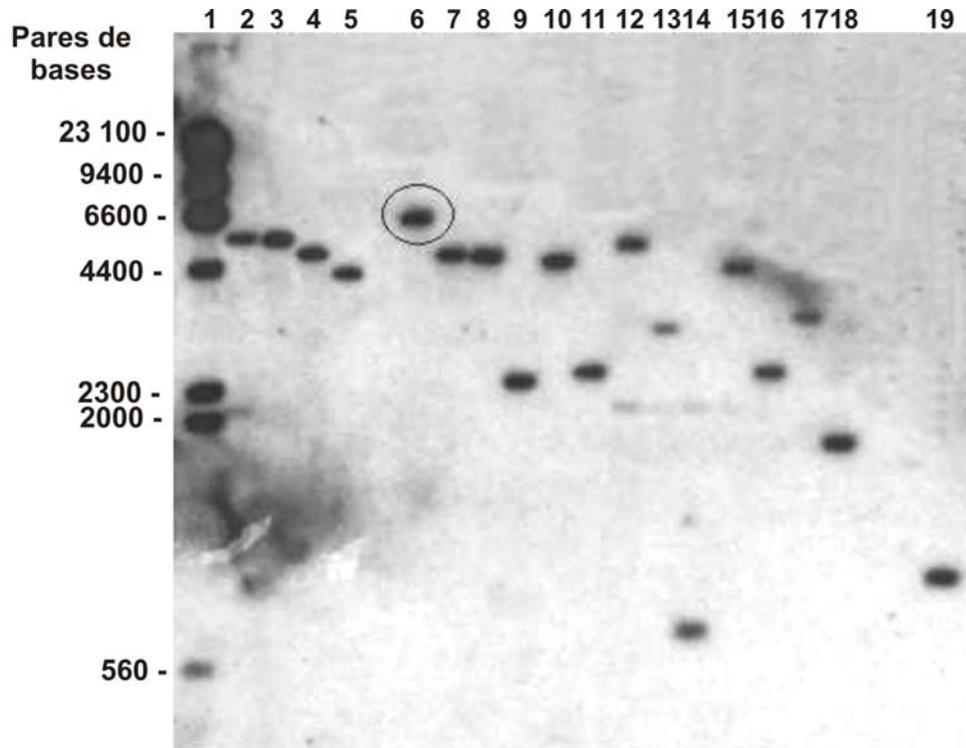


Figura 10. ADN_{genómico} digerido con diferentes enzimas de restricción. Radiograma de la hibridización de la sonda “ $2[^{35}\text{S}]$ ” contra el ADN_{genómico} de *D. hansenii* doblemente digerido con las enzimas: *Nco* I- *Bam*H I (2), *Hpa* I - *Nsi* I (3), *Hpa* I - *Bgl* I (4), *Bgl* I - *Bam*H I (5), *Hpa* I- *Bam*H I(6), *Bgl* I - *Nsi* I (7), *Hpa* I - *Eco*R I (8), *Kpn* I - *Bgl* I (9), *Nsi* I - *Bam*H I (10), *Kpn* I-*Nsi* I (11), *Hpa* I - *Nco* I (12), *Bgl* I - *Nco* I(13), *Kpn* I - *Nco* I (14), *Nco* I - *Eco*R I(15), *Kpn* I - *Hpa* I (16), *Bgl* I - *Eco*R I (17), *Kpn* I - *Bam*H I (18) y *Bam*H I - *Eco*R I (19). En la hibridización se utilizó λ *Hind* III como estándar de tamaño de ADN en pares de bases (1). La digestión que produjo una banda del ADN $\approx 7 \times 10^3$ pares de bases se indica con un círculo.

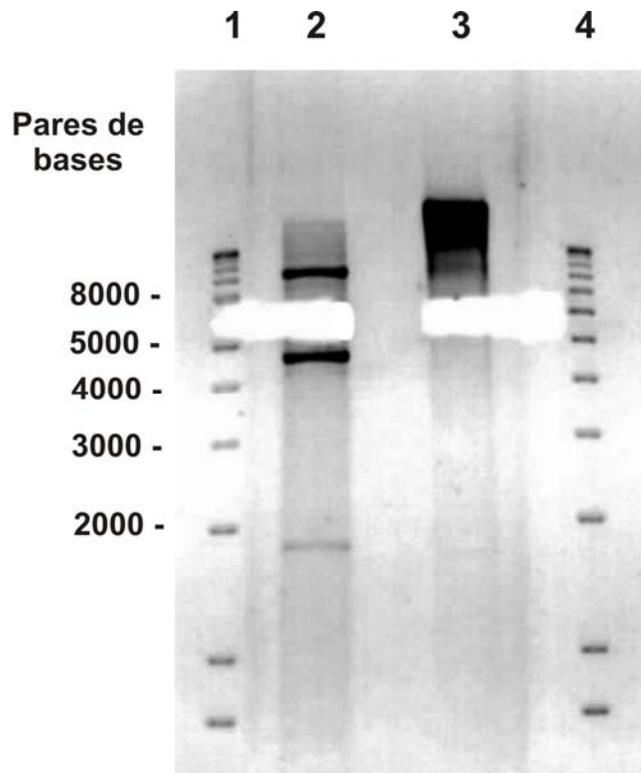


Figura 11. ADN_{genómico} digerido con *Hpa* I - *Bam*H I y *Kpn* I. Fotografía de un gel de agarosa (1%) para ADN, con los cortes de las fracciones de agarosa con el ADN de tamaño de 7×10^3 pares de bases, en muestras de ADN digerido con las enzimas *Hpa* I - *Bam*H I (2) o con la enzima *Kpn* I (3).

b) Clonación de los fragmentos del ADN_{genómico}. De cada porción de agarosa (fig 11) se extrajo y purificó el ADN, que se insertó en el vector pBuescript SK⁻. Posteriormente se hicieron transformaciones bacterianas con los productos de ligación en la bacteria *E. coli*. Los resultados de la transformación bacteriana no fueron positivos, ya que el número de colonias por caja petri debió de haber sido de 1×10^3 colonias de *E. coli* y solamente se obtuvieron entre cinco a diez colonias por caja de Petri. Se optó entonces por otra estrategia para obtener la secuencia completa de cada gen.

c) Segunda estrategia para obtener la secuencia de los genes con posible respuesta a estrés salino. Como alternativa se compararon las secuencias de los fragmentos de ADN_c contra el genoma de *D. hansenii* del

banco Génolevures, que hasta el mes de marzo del 2003 tenía más del 70% del genoma secuenciado y depositado en etiquetas de hasta 10 kpb. Se encontró una secuencia completa de cada uno de los seis fragmentos del ADN_c. Cada una tenía un tamaño entre 2000 a 10 000 pares de bases por lo que fue necesario llevar a cabo un análisis para determinar la región de codificación de cada gen. El análisis se hizo con el programa ORF-Finder, se buscaron los marcos de lectura abierta (ORF) y se tomó como criterio de selección que no presentase codones de término intermedios. Los resultados de la comparación se presentan en la tabla II. Para asignar una posible función celular a los genes encontrados, se comparó cada una de las secuencias en el programa BLASTX, con el que se obtiene la secuencia de aminoácidos de la proteína y después realiza una comparación con las secuencias de proteínas reportadas para otros organismos. En la tabla II se indica la posible función celular de cada gen asignada de acuerdo al porcentaje de similitud entre la secuencia de aminoácidos de la proteína analizada y la de referencia.

Con las secuencias de cada gen se diseñaron oligonucleótidos de anclaje específico y se obtuvieron los genes mediante su amplificación por PCR a partir del ADN_{genómico} de *D. hansenii*. En la figura 12 se observa que el producto de la amplificación es igual al tamaño esperado de cada gen (Tabla II).

Tabla II. Resultados de la comparación entre los fragmentos del ADN_c y el banco de secuencias de *D. hansenii* del proyecto Génolevures

Fragmento de ADN _c		Secuencia del ADN del banco de <i>Debarymyces hansenii</i>			Posible función celular (BLASTX)
Nombre	Tamaño (bases)	Tamaño (bases)	Región que codifica para el gen		Identidad en porcentaje con la secuencia en aminoácidos reportada
" ³⁵ S-1"	370	2552	1001-2473	(490 aa)	Gap1 de <i>C. albicans</i> 38 %
" ³⁵ S-2"	318	2771	638-1107	(368 aa)	Aro4 de <i>S. cerevisiae</i> 80 %
" ³⁵ S-3"	190	2715	1101-1715*	(204 aa)	GTP-Hidrol. de <i>S. pombe</i> 60 %
"Ag-4"	454	1114	336-1049	(237 aa)	Mer1 de <i>S. cerevisiae</i> 31%
"Ag-5"	374	5220	1017-4220*	(1067 aa)	eIF4-4F de <i>S. cerevisiae</i> 42 %
"Ag-6"	155	4272	2426-4255	(609 aa)	Cbk1 de <i>S. cerevisiae</i> 63 %

*Secuencias de genes que tienen mil pares de bases antes y después de la región codificante.

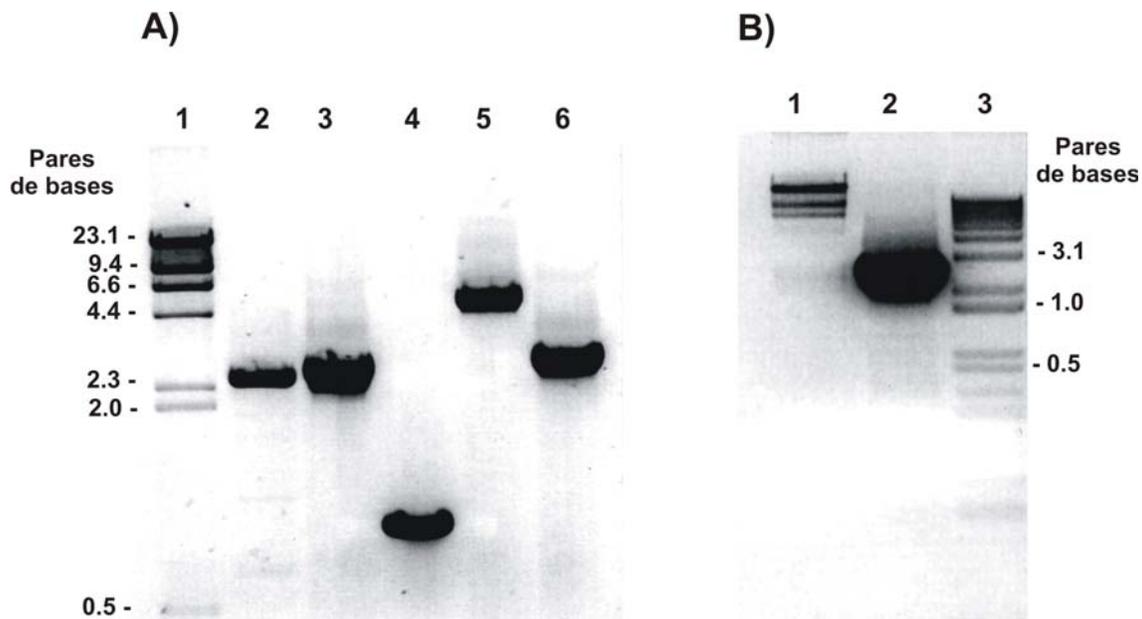


Figura 12. Amplificación por PCR de los genes de halo-respuesta. Fotografía de un gel de agarosa (1%) para ADN. Panel A, carriles 2-6 genes: “³⁵S-1” (*GAP 1*), “³⁵S-3” (*GTP-H*), “Ag-4” (*MER1*), “Ag-5” (*eIF4-4F*), “Ag-6” (*CBK1*). Panel B, carril 2 gen “³⁵S-2” (*ARO4*). Se utilizó λ *Hind* III como estándar de tamaño del ADN en kilo pares de bases carril 1 (Panel A y B) y ADN de 1000 kilo pares de bases carril 3 (Panel B).

d) Verificación de los genes de respuesta a estrés salino mediante hibridización con el ADN cromosómico de *D. hansenii*. Una vez obtenida la secuencia completa de cada gen, se llevó a cabo la verificación tipo Southern blot y la determinación de la posición de cada gen en los cromosomas de *D. hansenii*. Para obtener los cromosomas de *D. hansenii* se siguieron dos protocolos de cromosomas embebidos en agarosa, el propuesto para *S. cerevisiae* (Vézhinet *et al.*, 1990) que no produjo resultados satisfactorios ya que después de realizar una electroforesis de campos con pulsos (pulsed field gel electrophoresis) se observó degradación de los cromosomas (Fig 13A), y el protocolo propuesto para *Yarrowia lipolytica* (Casarégola *et al.*, 1997) que mejoró sustancialmente los resultados (Fig 13B) ya que los cromosomas se observaron completos y bien definidos.

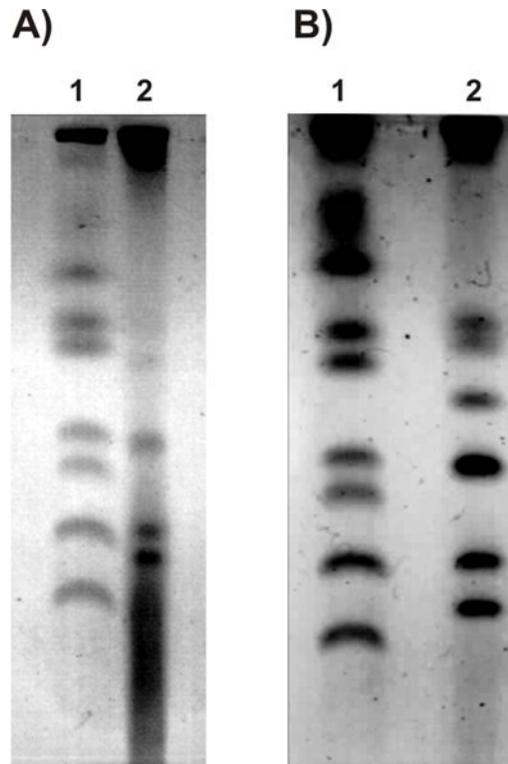


Figura 13. Extracción de cromosomas de *D. hansenii*. Electroforesis por campos en pulsos de los cromosomas de *D. hansenii* (carril 2) comparando dos protocolos: para *S. cerevisiae* (panel A) y para *Y. lipolytica* (panel B). Se utilizó el ADN cromosómico de *Hansenula wingei* (carril 1) como estándar de tamaño del ADN.

Una vez determinadas las mejores condiciones de la extracción y los tiempos de separación de la electroforesis, se hizo la transferencia de los cromosomas a membrana de nylon para su posterior hibridización con cada uno de los posibles genes de respuesta a estrés salino. En la figura 14 se observa la posición de cada uno de los genes en los cromosomas de *D. hansenii* que es igual a la reportada en el banco Génolevures: *ARO4* (DEHA0A0479g) y *MER1* (DEHA0A11517g) en el cromosoma A, *EIF4-4F* en el cromosoma C (DEHA0C10626g), *CBK1* (DEHA0F13981g) en el cromosoma F. La única excepción fue en el gen de la GTP-Hidrolasa1 que en el presente trabajo se ubicó en el cromosoma E y en la base de datos de Génolevures está anotado en el cromosoma G (DEHA0G10329g). Con los resultados anteriores se dio por concluida la estancia en el Laboratorio de microbiología y genética molecular (INAP-G, Francia).

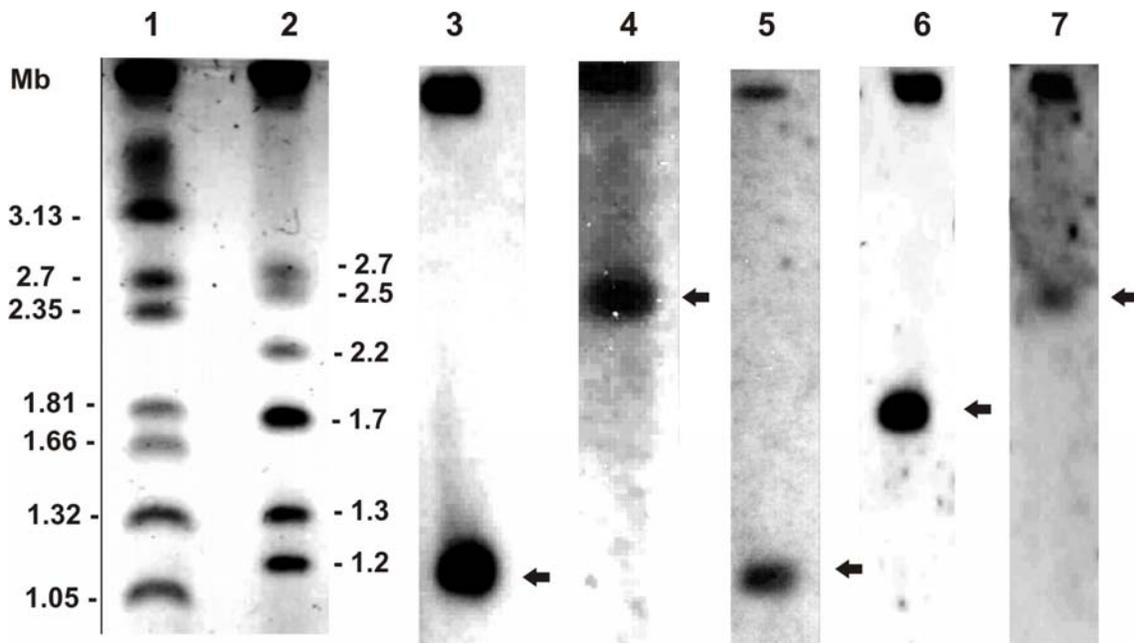


Figura 14. Posición de los genes de halo-respuesta en cromosomas de *D. hansenii*. Fotografía de la separación de los cromosomas de *D. hansenii* (2), posición de los genes en los cromosomas de *D. hansenii*. ³⁵S-2" ARO4 (3), ³⁵S-3" GTP-HI (4) "Ag-4" MER1 (5), "Ag-5" eIF4-4F (6) y "Ag-6" CBK1 (7). Se utilizó el ADN cromosómico de *Hansenula wingei* como estándar de tamaño del ADN (1).

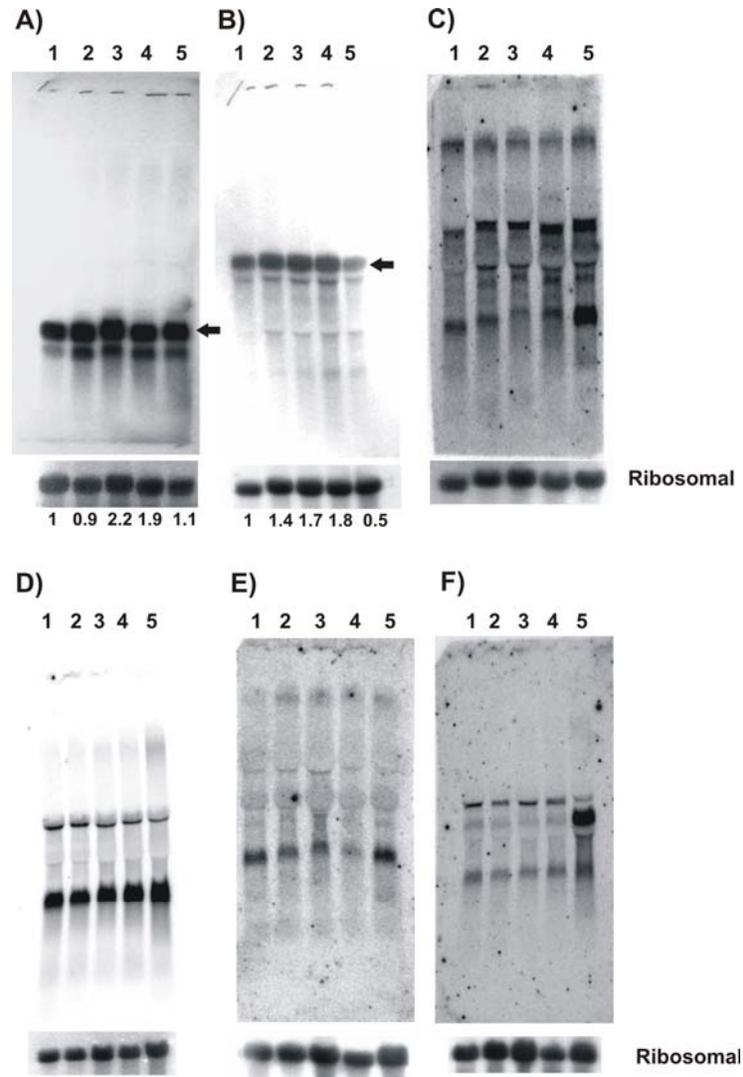


Figura 15. Verificación del aumento en los niveles de transcritos debido a la presencia de condiciones hiperosmóticas. Radiograma de gel de agarosa y formaldehído para el ARN_{Total} de *Debaryomyces hansenii*, que muestra las hibridaciones Northern blot de los genes aislados: “³⁵S-2” ARO4 (A), “Ag-5” eIF4-4F (B), “³⁵S-1” GAP1 (C), “³⁵S-3” GTP-Hidrolasa1 (D), “Ag-4” MER1 (E); y “Ag-6” CBK1 (F), en las condiciones de crecimiento del control (1), estrés salino por NaCl 0.6 M (2), NaCl 2M (3) y KCl 2M (4) y estrés osmótico por sorbitol 2 M (5). Se utilizó el gen del ARN_{ribosomal} 17S de *D. hansenii* (panel inferior) como control de carga de ARN_{Total} en cada muestra y para validar el aumento del ARN_{mensajero} de cada gen. El aumento del transcrito de cada gen con respecto al control se indica con el número inferior al ARN_{ribosomal} solo para los genes “³⁵S-2” ARO4 (A) y “Ag-5” eIF4-4F (B), la banda específica del ARN_{mensajero} de hibridación de estos dos genes se señala con una flecha, para los genes restantes no se presenta la cuantificación del aumento debido a la presencia de mas bandas de hibridación en diferentes regiones del mismo radiograma (panel C, D, E y F).

En el Departamento de Genética Molecular, en el laboratorio del Dr. Peña, se llevaron a cabo los ensayos Northern blot de los genes a fin de verificar un aumento en los niveles de transcriptos debido a condiciones de hiper-osmolaridad. En la fig 15 se presentan los resultados de las hibridaciones de los genes con muestras del ARN_{Total} de *D. hansenii*, creciendo en ausencia de sales, y presencia de NaCl 0.6 y 2 M, KCl 2 M y Sorbitol 2 M. Sólo los transcriptos de los genes “³⁵S-2” (*ARO4*), “Ag-5” (*eIF4-4F*) y “³⁵S-1” (*GAP1*) aumentaron en las condiciones de estrés osmótico elevado, mientras que el ARN_{mensajero} de los genes “³⁵S-3” (GTP-Hidrolasa), “Ag-4” (*MER1*) y “Ag-6” (*CBK1*) no aumentó en ninguno de los tratamientos de estrés osmótico elevado. En el análisis por densitometría de la hibridación del ARN_{ribosomal} 17S de *D. hansenii* se confirmó que en el tratamiento con NaCl 2 M aumento 2.2 veces el transcripto de *ARO4* y 1.9 vez el de *eIF4-4F* con respecto al control sin sales. En lo que concierne al gen *GAP1* se observó el incremento de más de una banda del ARN_{mensajero} y para descartar la presencia de contaminación por ARN_{mensajero} no específico, se repitió el Northern con el gen *GAP1*. Para tener una mayor especificidad en la hibridación del gen *GAP1*, la sonda se purificó por amplificación de PCR y clonación en el plásmido pCRII-TOPO. La hibridación de *GAP1* contra el ARN_{Total} de *D. hansenii* presentó una sola banda del ARN-mensajero de *GAP1*, pero no se confirmó el aumento en las condiciones del estrés osmótico por sorbitol 2 M (Fig 16). El análisis por densitometría de la hibridación del ARN_{ribosomal} confirmó que no hubo ningún aumento del ARN_{mensajero} del gen *GAP1* en las condiciones del estrés osmótico, excepto con el estrés salino por KCl 2 M (figura 16), esto indicaría que el cambio en la expresión de *GAP1* se debe específicamente al estrés por potasio.

En resumen, los resultados anteriores demostraron que de los siete genes aislados originalmente con la técnica del despliegue diferencial en una subpoblación del ARN_{mensajero} de *D. hansenii* sometida a un estrés continuo por NaCl 2 M y KCl 2 M sólo los genes *eIF4-4F* y *ARO4* aumentaron la cantidad de ARN_{mensajero} (Fig 15).

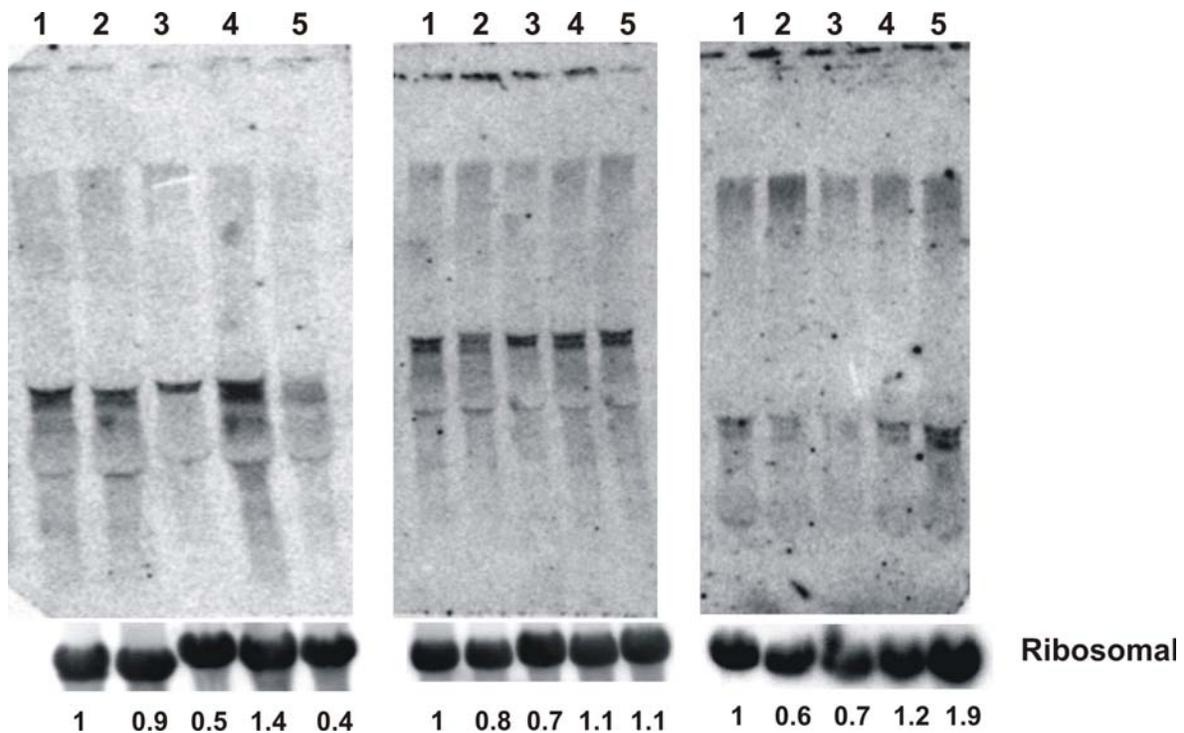


Figura 16. Detección del gen *GAP1*. Radiograma de gel de agarosa y formaldehído para el ARN total de *Debaryomyces hansenii*, que muestra 3 ensayos Northern blot del gen *GAP1* con el ARN total de *D. hansenii* en las condiciones de crecimiento del control (1), estrés salino por NaCl 0.6 M (2), NaCl 2 M (3) y KCl 2 M (4) y estrés osmótico por sorbitol 2 M (5). Se utilizó el gen del ARN_{ribosomal} 17S de *D. hansenii* (panel inferior) como control de carga de ARN_{Total} en cada muestra y para validar el aumento del ARN_{mensajero} de *GAP1*. Los números indican el aumento del transcrito de *GAP1* con respecto al control.

Verificación de la función de la proteína codificada por *DhARO4*.

Considerando que *ARO4* es el gen que presentó la mayor respuesta diferencial en presencia de NaCl 2 M se decidió confirmar la función de la proteína que codifica el gen *ARO4* de *D. hansenii*, mediante la complementación de la función de Aro4p en la mutante *aro4Δ* de *S. cerevisiae*.

Para verificar la complementación se determinó el fenotipo del crecimiento de las cepas silvestres y mutantes, sin transformar o transformadas en presencia de un exceso de fenilalanina y tirosina en el medio de cultivo (ya que la enzima Aro4p se inhibe específicamente en presencia de un exceso de tirosina) y se cuantificó el producto de la reacción enzimática en la que participa Aro4p.

a) Complementación de la mutante de *ARO4* de *S. cerevisiae* con *ARO4* de *D. hansenii*. Para complementar la mutante *aro4*, solamente se amplificó el gen *ARO4* de *D. hansenii* (*DhARO4*) en la región que codifica para la proteína Aro4 (ORF) y 500 pares de bases (pb) posteriores al término de la secuencia de *DhARO4*. Luego de insertar el gen *ARO4* en el vector pCRII-TOPO, la construcción pCRII-TOPO-*DhARO4* se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* (DH5 α). De las colonias seleccionadas como positivas se hizo una extracción de ADN del plásmido, el cual se digirió con la enzima *EcoR* I generando un fragmento de 1550 pb, que corresponde al tamaño del fragmento de ADN esperado de los oligonucleótidos. Para corroborar que el inserto que se obtuvo correspondía al tamaño de la secuencia de *ARO4* se hizo una digestión del plásmido con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Kpn* I; con *EcoR* I se liberó al inserto del plásmido y con *Kpn* I se obtuvieron dos fragmentos de aproximadamente 950 pb y 600 pb (Fig 17, carriles 3 y 5). Los fragmentos obtenidos con la enzima de restricción *Kpn* I fueron acordes a los tamaños obtenidos en el programa de análisis de restricción mapper3.

Para confirmar que los productos de clonación obtenidos en el vector pCRII-TOPO corresponden al gen *ARO4*, los plásmidos con el inserto se secuenciaron (Unidad de Biología Molecular, IFC-UNAM). El análisis del fragmento de 1550 pb secuenciado, comparado con el del banco de la NCBI mediante el programa Blast confirmó que la secuencia del inserto en el vector pCRII-TOPO tiene similitud del 72% con la secuencia del gen *ARO4* de *S. cerevisiae*.

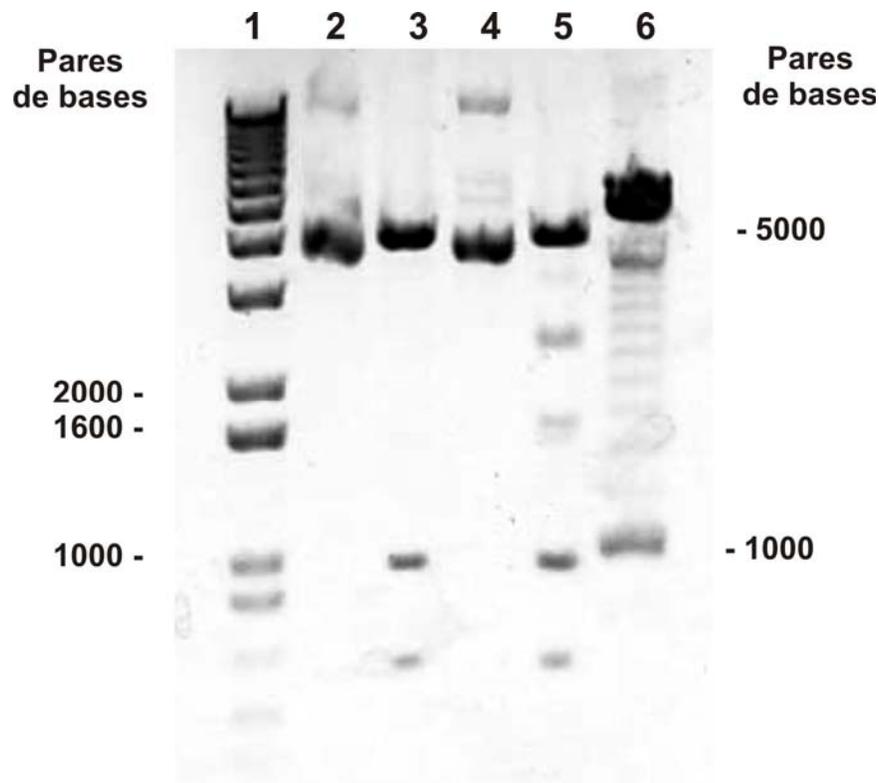


Figura 17. Clonación de ARO4 en el vector pCRII-TOPO. Gel de agarosa para ADN. Purificación y digestión de los plásmidos obtenidos de dos colonias de *E. coli* (DH α) seleccionadas como positivas (pCRII-TOPO con inserto del gen ARO4). Estándar de tamaño del ADN en pares de bases (carriles 1 y 6); plásmido de la colonia 1 sin digerir (2); plásmido de la colonia 1 digerido con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Kpn* I (3); plásmido de la colonia 2 sin digerir (4); plásmido de la colonia 2 digerido con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Kpn* I (5).

b) Subclonación de DhARO4 en el plásmido pYES. A fin de expresar el gen *DhARO4* en la mutante *aro4Δ* de *S. cerevisiae*, se subclonó el gen en el plásmido pYES que tiene un sitio de replicación para levaduras y para bacterias y además cuenta con el promotor del gen de la galactosa adyacente al sitio de inserción de secuencias de ADN que permite la transcripción obligada de la secuencia del gen de interés en un medio con galactosa. La introducción de pYES-*DhARO4* en la mutante *aro4Δ* de *S. cerevisiae* se realizó con el método de transformación de levaduras del LiCl. Las mutantes transformadas fueron cultivadas en medio mínimo con histidina, leucina, metionina y sin uracilo, pYES

tiene la secuencia del gen de la proteína que sintetiza uracilo, por lo que colonias cultivadas en este medio indican la presencia del plásmido pYES.

Para confirmar que las colonias de *S. cerevisiae* presentes en medio sin uracilo contenían al plásmido pYES-*DhARO4*, se hizo una extracción del ADN total (ADN_{genómico} de levadura y ADN de plásmido) que se utilizó en la transformación de *E. coli*. Se extrajo el ADN de plásmidos de las colonias positivas y se liberó el gen *DhARO4* del plásmido pYES mediante una digestión con las enzimas *EcoR* I y *BamH* I, que produjeron un fragmento de 1600 pb (Figura 18). Con lo anterior se comprobó la inserción del gen *DhARO4* en mutantes de *aro4Δ* de *S. cerevisiae*.

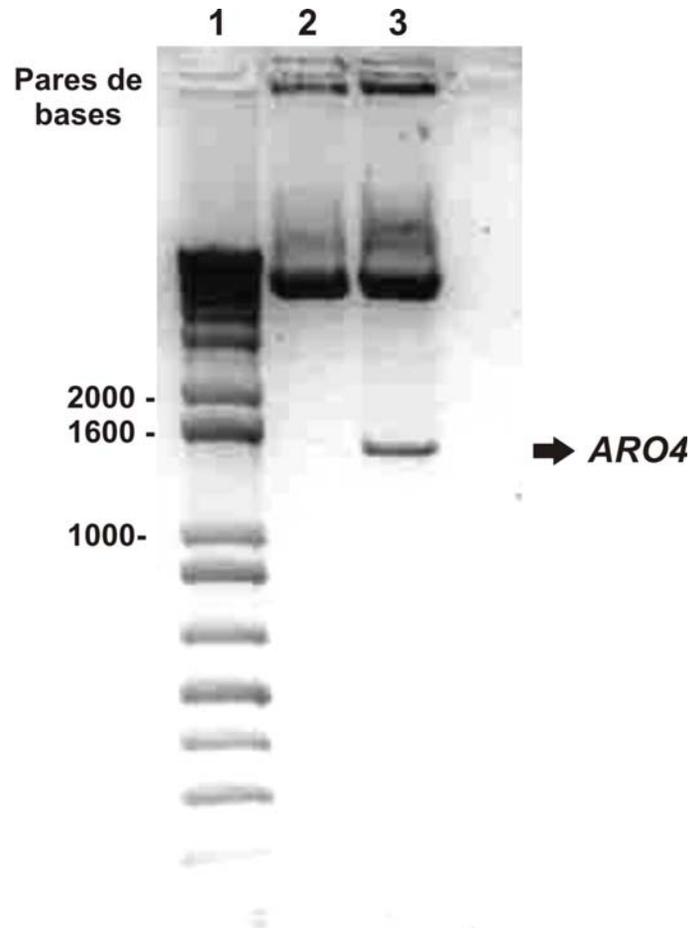


Figura 18. Subclonación de *DhARO4* en el plásmido pYES. Fotografía de un gel de agarosa para ADN. Purificación de los plásmidos de dos colonias de *E. coli* (DH α) transformadas con el ADN de mutantes *aro4Δ* de *S. cerevisiae* con o sin el plásmido pYES-*DhARO4*. La digestión de plásmidos con la enzima *EcoR* I produjo pYES vacío (2) o pYES vacío y la secuencia de *DhARO4* (3). Estándar de tamaño del ADN en pares de bases (1).

c) Determinación fenotípica de las cepas silvestre, mutante nula y mutante complementada con *DhARO4*.

Para determinar el fenotipo de crecimiento de las mutantes *aro4Δ* de *S. cerevisiae* sin transformar y transformada con *DhARO4* y compararla con el fenotipo de crecimiento de la cepa silvestre de *S. cerevisiae*, las cepas fueron crecidas en cajas Petri con medio MM-agar, galactosa, uracilo (para evitar la interferencia de la auxotrofia) y exceso de fenilalanina (5mM) o fenilalanina-tirosina (5 mM cada uno). En el medio mínimo con fenilalanina 5 mM, la mutante transformada con *DhARO4* presentó un crecimiento similar a la cepa silvestre; es decir, que suprimió el retardo en el crecimiento observado en la mutante *aro4Δ* no transformada y en la mutante *aro4Δ* transformada con el plásmido vacío (Fig 19A) Mientras que en el medio MM-agar, galactosa, uracilo con un exceso de fenilalanina y tirosina (5 mM) no hubo crecimiento de la cepa silvestre, ni de las mutantes *aro4Δ* sin transformar y transformadas con *DhARO4*. El crecimiento nulo de colonias bajo estas condiciones concuerda con lo encontrado por Sousa *et al.* (2002) debido a que la presencia de los dos aminoácidos (fenilalanina y tirosina) inhiben las enzimas Aro3p y Aro4p.

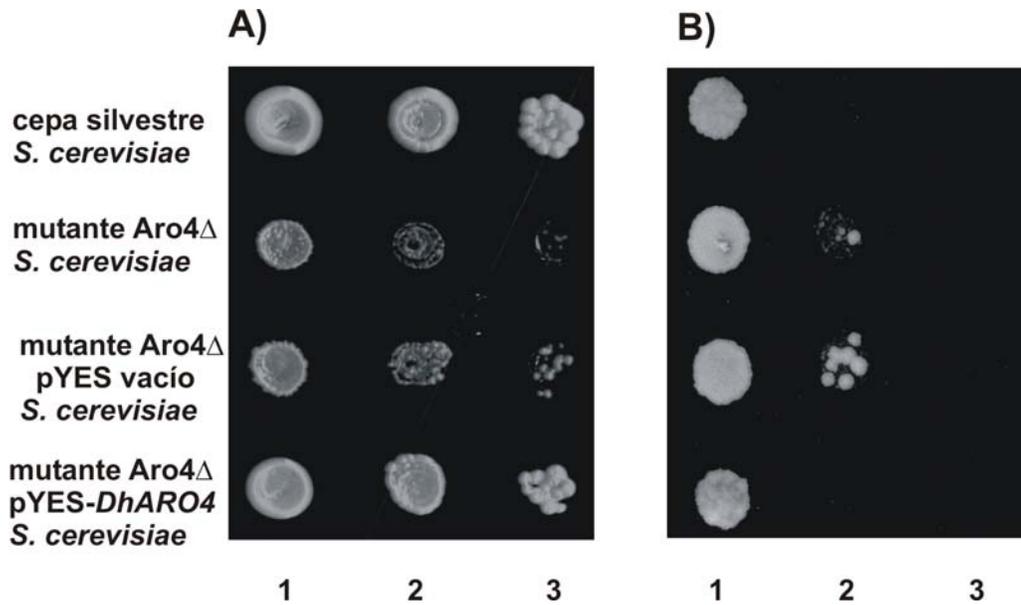


Figura 19. Fenotipo de la expresión heteróloga de *DhARO* en *S. cerevisiae*. Crecimiento de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* y la mutante *Aro4Δ* de *S. cerevisiae* sin transformar, y transformada con el plásmido pYES vacío o con pYES-*DhARO4*. Crecimiento de colonias después de 96 horas de incubación a 30° C, en medio MM-agar, galactosa, metionina, histidina, leucina y uracilo en presencia de fenilalanina 5 mM (panel A) y en presencia de fenilalanina-tirosina 5 mM (panel B). Los números indican la muestra sin diluir (1), y diluciones de la muestra de 1:100 (2) y de 1:10 000 (3).

d) Ensayo enzimático de Aro4p. El gen *ScARO4* codifica para la enzima 3-deoxy-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintetasa, inhibida por tirosina (DAHP^{Tir}). La DAHP^{Tir} convierte la eritrosa-4-fosfato (en presencia de fosfoenol-piruvato) a 3-deoxy-d-arabinoheptulosonato-7-fosfato (citada en Sousa *et al*, 2002), producto que puede medirse por absorbancia a 549 nm. Considerando que la reacción puede reproducirse en el laboratorio, además de que el producto de la reacción enzimática puede medirse por espectrofotometría de luz visible (549 nm), se midió la actividad de Aro4p.

Las actividades enzimáticas de *ScAro4p* y *DhAro4p* se determinaron con el protocolo propuesto por Takahashi y Chan (1970) y las modificaciones de Subramaniam *et al.* (1998). En la tabla III se observa que la mutante transformada con el plásmido pYES-*DhARO4* restituye los valores de actividad enzimática de la DHAP^{Tyr} de 0.092 U·mg⁻¹ de la cepa silvestre de *S. cerevisiae*, mientras que la

mutante transformada con el plásmido pYES vacío tuvo el mismo valor basal de actividad de la DAHP^{Tyr} de 0.017 U·mg⁻¹ de la mutante sin transformar (Tabla III). Se concluyó así que el gen de *ARO4* de *D. hansenni* reestablece la función de la proteína Aro4p en la mutante *aro4Δ* de *S. cerevisiae* transformada con *DhARO4*.

Tabla III. Valores de la actividad enzimática de la DAHP^{Tir} sintetasa en la cepa silvestre y las mutantes *Aro4Δ* de *S. cerevisiae* transformadas con *DhARO4*

Cepa	Densidad óptica (600 nm) ^a	Actividad específica de DHAP ^{Tir} (unidades/mg) ^b
cepa silvestre de <i>S. cerevisiae</i> ^c	0.54	0.092
mutante <i>aro4Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i>	0.62	0.017
mutante <i>aro4Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> con pYES vacío	0.58	0.017
mutante <i>aro4Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> con pYES- <i>DhARO4</i>	0.53	0.121

^a Densidad óptica del cultivo al momento de colectar las células.

^b Actividad específica en unidades por mg de proteína total. La medida se hizo en extractos crudos de células crecidas en medio MM galactosa con fenilalanina 5 mM. Cada valor de actividad específica es representativo de tres experimentos independientes, con una variación menor al 5%.

^c Como control de la actividad se utilizó la cepa silvestre de *S. cerevisiae*.

e) Respuesta de *DhARO4* al estrés por falta de aminoácidos y por estrés salino. Para determinar la posible regulación transcripcional de *DhARO4*, se analizó la región promotora de *DhARO4*, buscando el elemento de unión a Gcn4p (GCRE) definido por la secuencia: ATGACTCAA. En ausencia de aminoácidos Gcn4p se une a la secuencia GCRE, y permite la transcripción de *ARO4* de *S. cerevisiae* [Braus 1991; Kunzler *et al.*, 1992; Grundmann *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2002; Natarajan *et al.*, 2001] Con el análisis de la región promotora se encontró que *DhARO4* tiene dos secuencias posibles tipo GCREs en las posiciones -135 (GCRE1, ATGACTCAT) -143 (GCRE2, ATGATTCAA); estas secuencias son diferentes en una base de la secuencia consenso de GCRE en *ARO4* de *S. cerevisiae* (Tabla IV). Después de comparar con las secuencias

GCRE de *C. albicans*, se encontró que las secuencias GCRE de *D. hansenii* tienen dos nucleótidos diferentes a los sitios GCRE de *C. albicans* (Tabla IV). El análisis también incluyó la búsqueda de secuencias de regulación asociadas a la respuesta a estrés osmótico como STRE (secuencia CCCCT). En presencia de estrés osmótico, HOG es la vía de señalización para la transcripción de genes de respuesta al estrés osmótico, y Hog1p suele unirse a secuencias tipo STRE en los genes de respuesta a estrés osmótico. Otro elemento de respuesta es el sitio CRE (elemento de respuesta vía AMPcíclico) cuya secuencia es TGACGTCA [García-Gimeno y Struhl, 2000]. Los elementos CRE pueden ser el sitio de unión tanto para Gcn4p o Sko1p, en condiciones de crecimiento óptimo Sko1p actúa como represor de la transcripción de genes como *HAL1*; sin embargo, en presencia de estrés por falta de aminoácidos se ha determinado que Hog1p es el anti-represor de Sko1p, y una vez que el sitio CRE está libre, se le une el activador Gcn4p para dar inicio a la transcripción del gen *HAL1* (Pascual-Ahuir *et al.*, 2001). En la región promotora de *DhARO4* se encontraron tres posibles sitios CRE en las posiciones -313 (CRE1, TGACGTCG), -321 (CRE2, ATACGTAA) y -844 (CRE3, TGACGTCA) (Tabla IV). Estos resultados permitieron hacer la propuesta de que *DhARO4* es un gen regulado por Gcn4p vía sus dos sitios GCRE, y por lo tanto responde a un estrés por falta de aminoácidos. Dado que *DhARO4* aumenta su expresión ante el estrés salino elevado, probablemente en esta condición la regulación de *DhARO4* se deba a una interacción con sus sitios CRE.

Tabla IV. Sitios tipo GCRES y CREs en el promotor de *DhARO4* de *D. hansenii* comparados contra los sitios GCRES funcionales en *S. cerevisiae* y *C. albicans*

Especies	Promotor	Posición y secuencia	Referencia
<i>S. cerevisiae</i>	GCRE _{ARO4}	⁻³¹² ATGACTCAA ⁻³⁰⁴	Künzler <i>et al</i> , 1997
<i>C. albicans</i>	GCRE _{ARO4}	⁻²⁷¹ ATGACTAAA ⁻²⁶³ ⁻³⁰¹ ATGACTGAA ⁻²⁹³ ⁻³³⁶ CGGACTATT ⁻²⁹⁸	Sousa <i>et al</i> , 2002 Sousa <i>et al</i> , 2002 Sousa <i>et al</i> , 2002
<i>D. hansenii</i>	GCRE _{ARO4}	⁻¹³⁵ ATGACTCAT ⁻¹²⁷ ⁻¹⁴³ ATGATTCAA ⁻¹³⁵	Presente trabajo Presente trabajo
<i>S. cerevisiae</i>	CRE _{HAL1}	⁻²⁰⁰ TGACGTCA ⁻¹⁹³ ⁻²²⁴ TTACGTAA ⁻²¹⁷	Rep <i>et al</i> , 2001 Rep <i>et al</i> , 2001
<i>D. hansenii</i>	CRE _{ARO4}	⁻³¹³ TGACGTCTG ⁻³²⁰ ⁻⁸⁴⁴ TGACGTCA ⁻⁸⁵¹ ⁻³²¹ ATACGTAA ⁻³²⁸	Presente trabajo Presente trabajo Presente trabajo

Para determinar si en efecto, *DhARO4* responde al estrés por falta de aminoácidos, se evaluó la respuesta del ARN_{mensajero} de *DhARO4* frente a un estrés por ayuno de aminoácidos, y para determinar si el efecto del estrés por ayuno de aminoácidos es de la misma magnitud que el efecto del estrés salino se midió la respuesta del transcripto de *DhARO4* al efecto doble de un estrés salino y falta de aminoácidos. El ayuno por aminoácidos se impuso con 3-aminotriazol (3AT) 10 mM, inhibidor de la síntesis de histidina (Spurgeon y Matchett, 1977) por seis horas en ausencia o presencia de NaCl 2 M. Se encontró que el ARN_{mensajero} de *DhARO4* en el choque por 3AT 10 mM aumenta 2.5 veces con respecto al control (control sin 3AT); en el tratamiento con NaCl 2 M el transcripto de *ARO4* aumenta 2 veces respecto del control, mientras que en el tratamiento del efecto combinado de estrés continuo por NaCl 2 M y 3AT 10 mM aumentó 5 veces con

respecto al control (Fig 20). Esto indica que el gen de *DhARO4* responde al estrés por falta de aminoácidos y al estrés salino de forma independiente.

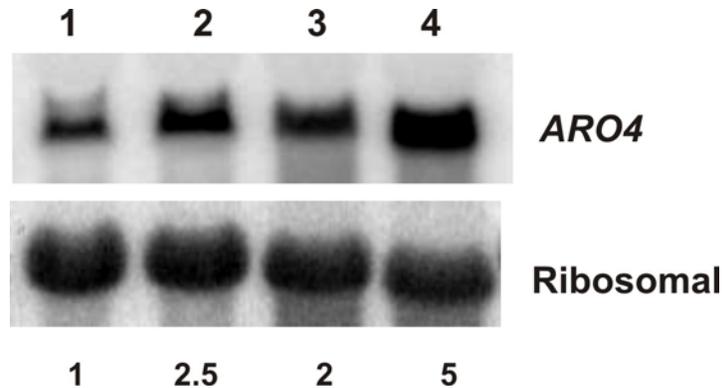


Figura 20. Northern blot del estrés salino y por falta de aminoácidos. Hibridizaciones Northern blot de *DhARO4* en muestras del ARN_{Total} de *D. hansenii* cultivada en ausencia de estrés (1), estrés por falta de aminoácidos con 3AT 10 mM (2), estrés salino por NaCl 2 M (3) y efecto combinado de estrés por 3AT 10 mM y NaCl 2 M (4). Se utilizó el gen del ARN_{ribosomal} 17S de *D. hansenii* (panel inferior) como control de carga de ARN_{Total} en cada muestra y para validar el aumento del ARN_{mensajero} de *DhARO4* en las diferentes condiciones de crecimiento. Los números indican el aumento del transcrito de *DhARO4* con respecto al control.

Finalmente, para determinar si *DhARO4* es un gen de respuesta inmediata o continua al ocurrir un cambio en la salinidad del medio, se realizó una serie de tiempo en la que se midieron los cambios del ARN_m de *DhARO4* después de un choque salino por NaCl 2 M por 27 horas. Se encontró que al tiempo cero el transcrito de *DhARO4* disminuye 0.5 veces con respecto al control (sin sales), después de tres horas el transcrito aumenta hasta el mismo valor que el control (nivel basal); una vez que reinicia su crecimiento, el ARN_m de *DhARO4* aumenta hasta un valor de 2.6 veces con respecto al control (Fig 21). Con ello se puede concluir que *ARO4* no es un gen de respuesta inmediata a un cambio en la salinidad del medio y que su expresión aumenta después de que la célula se adapta a las condiciones de salinidad en el medio.

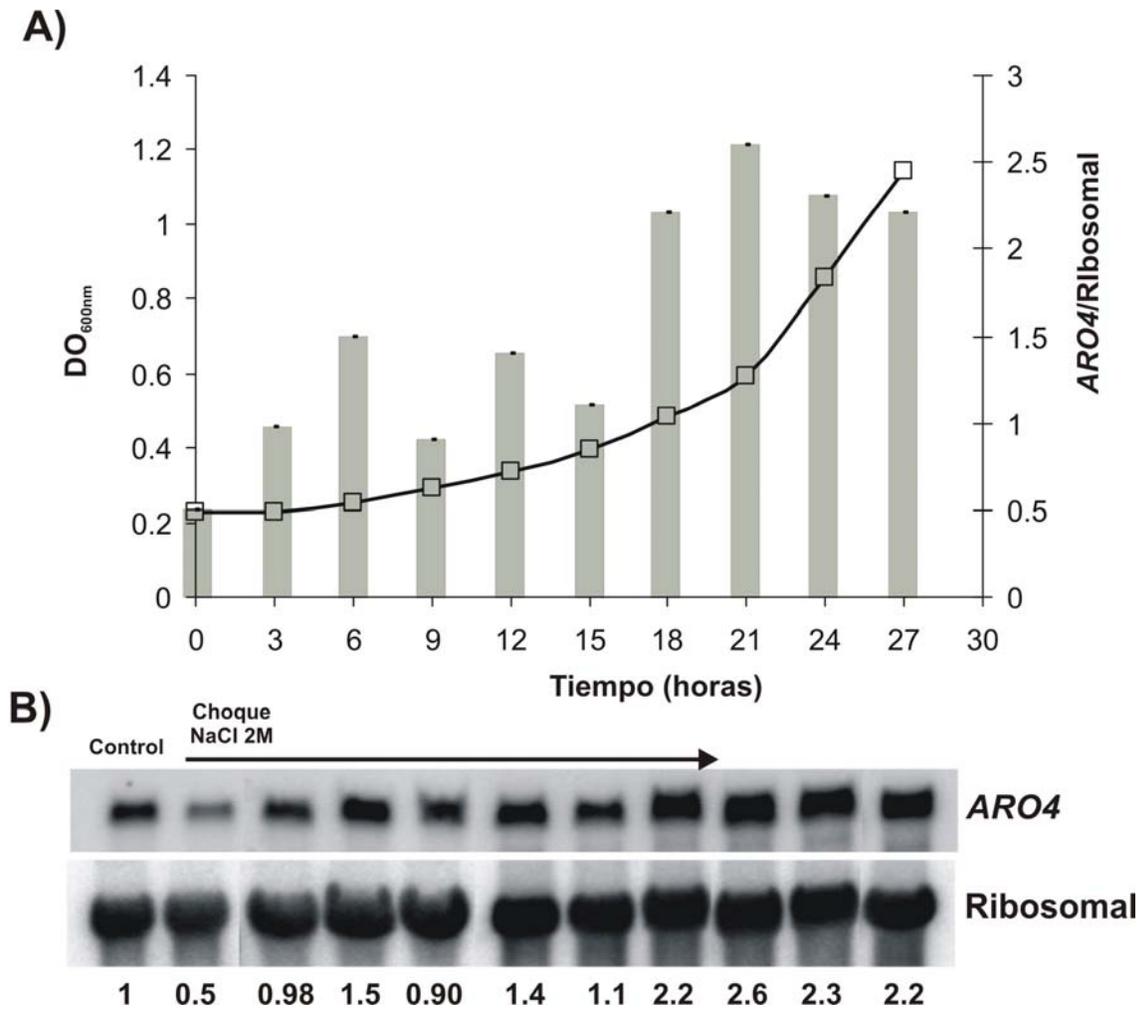


Figura 21. Serie de tiempo para la evaluación del transcrito de *DhARO4* después de choque salino. Gráfico de la densidad celular y aumento del ARNm de *DhARO4* contra tiempo durante 27 horas (panel A). Hibridización tipo Northern blot de *DhARO4* en muestras del ARN total de *D. hansenii* expuesta a un choque salino con NaCl 2 M (panel B). Se utilizó como control de carga del ARN total el gen del ARN_{ribosomal} 17 S de *D. hansenii*. Los números indican el aumento del transcrito de *DhARO4* con respecto al control.

6. DISCUSIÓN

En este trabajo se analizó la expresión genética de *D. hansenii* expuesta a estrés hipersalino por NaCl 2 M. Para este propósito, se empleó la técnica denominada despliegue diferencial (Liang y Pardee, 1992). Aunque la técnica ha sido aplicada con éxito en diversos organismos (Donohue *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1997; Miura *et al.*, 2000; Mong *et al.*, 2002), puede presentar resultados falsos positivos o escasos (Catalano *et al.*, 1997; Sturtevant, 2000; Lievens *et al.*, 2001) que pueden adjudicarse a diferentes causas, como la calidad del ARN_{Total}, contaminación por ADN, o que los fragmentos de ADN_c en el gel de poliacrilamida estén compuestos por más de una banda (Ali *et al.*, 2001). En el presente trabajo se tuvieron resultados escasos con la técnica del despliegue diferencial, ya que sólo se observaron alrededor de treinta bandas del ADN_c en el gel de poliacrilamida después de una amplificación por PCR con marcaje radioactivo (Fig 4) y aproximadamente 40 bandas de ADN_c al utilizar la tinción con plata (Fig 5) con una mayoría de ADN_c falsos positivos de una expresión diferencial (Fig 14). Se considera que las principales causas en el bajo rendimiento de la técnica del despliegue diferencial aplicado a *D. hansenii* fueron la degradación del ARN_{Total} durante su extracción y su purificación. Se encontró que la extracción del ARN_{Total} debe ser rápida, en comparación con los protocolos propuestos para *S. cerevisiae*, que suelen utilizar un tiempo de extracción con fenol caliente hasta de 30 minutos; aplicando este tiempo a la extracción del ARN_{Total} en *D. hansenii* se encontró que el ARN_{Total} se degrada; por tanto, se disminuyó el tiempo de extracción con fenol caliente a 10 minutos, y para obtener la mayor cantidad posible en un tiempo menor se añadieron perlas de vidrio. Aunque no se tienen los elementos suficientes para sugerir la causa, se plantea la posibilidad de que la degradación del ARN_{total} se deba a la presencia de una pared celular con un mayor grosor en *D. hansenii* que en *S. cerevisiae*, que no permitiría la rápida inhibición general de enzimas que degradan el ARN, por lo que una exposición prolongada en fenol sin la ruptura celular rápida y efectiva aumentaría la degradación. La observación de una mayor degradación del ARN_{Total} en estas condiciones podría apoyarse en los

trabajos de *D. hansenii* creciendo en quesos, en los que se ha determinado que presenta una mayor actividad de enzimas proteasas en el citoplasma que en la pared celular (Kumura *et al.*, 2002).

En lo que respecta a la purificación del ARN_{Total}, el factor determinante es la completa eliminación del ADN_{genómico}, que en el caso de *D. hansenii* también produjo la pérdida de ARN_{Total}, disminuyendo en consecuencia el tamaño de la subpoblación del ARN_{mensajero} que se obtuvo. La técnica del despliegue diferencial permite analizar subpoblaciones del ARN_{mensajero} hasta de 50 a 100 mensajes (Liang y Pardee, 1992) por cada oligonucleótido de anclaje del tipo dT_n-MN, y en el presente trabajo sólo se obtuvo una subpoblación de alrededor de 30 a 40 mensajes (Figuras 3 y 4). Esta subpoblación en *D. hansenii* se logró una vez eliminado por completo el ADN_{genómico} en las muestras del ARN_{Total} por medio de la digestión con una ADN-endonucleasa, una re-extracción con fenol, y la precipitación con LiCl que es selectiva para nucleótidos de tamaño molecular pequeño como el ARN de transferencia o fragmentos pequeños de ADN (Sambrook, *et al.* 1989). Aunque se consideró utilizar tres oligonucleótidos de anclaje para aumentar el número de ARN_{mensajeros}, no fue posible obtener una mayor subpoblación del ARN_m en *D. hansenii*.

La aplicación del despliegue diferencial en *D. hansenii* en las condiciones del control original (sin sales) fue negativa, ya que no se obtuvieron fragmentos del ADN_c, a pesar de haber repetido en varias ocasiones el despliegue diferencial en estas condiciones, por lo que se sustituyó el control del despliegue diferencial por el resultado del crecimiento en presencia de NaCl 0.6 M. En diferentes trabajos se ha determinado que en *D. hansenii* la presencia de NaCl 0.6 M en el medio no modifica los parámetros de crecimiento, como la velocidad específica de crecimiento o el tiempo de duplicación (Prista *et al.*, 1997; González-Hernández *et al.*, 2004).

En un primer intento por probar que siete de los fragmentos del ADN_c resultantes del despliegue diferencial, pertenecían al ADN_{genómico} de *D. hansenii* y que su expresión aumentaba en las condiciones del estrés salino, se hicieron hibridaciones Southern blot y Northern blot (respectivamente) con un método de

fluorescencia con el que no se tuvieron resultados positivos. Cuando se pudieron llevar a cabo las hibridaciones en presencia de radioactividad sólo se realizaron los ensayos Northern blot de tres fragmentos y se encontró que dos aumentaban en el tratamiento con NaCl 2M. Aunque no se tenía la confirmación de que todos los fragmentos del ADN_c obtenidos provenían de *D. hansenii* ni de un cambio en su expresión en condiciones de estrés hiper-salino, se decidió obtener la secuencia completa de seis fragmentos del ADN_c. Como primera estrategia se intentó preparar una minibiblioteca de ADN para hacer un escrutinio con cada uno de los fragmentos del ADN_c y para obtener la secuencia de cada uno de los genes de respuesta a salinidad elevada. Pero no se obtuvo la minibiblioteca genómica, ya que la clonación de fragmentos del ADN_{genómico} de 7×10^3 pares de bases en el plásmido pBluescript SK⁻ fue deficiente, porque clonar fragmentos con ese tamaño en el vector pBluescript SK⁻ probablemente no fue lo correcto, ya que los productos de clonación en *E. coli* fueron muy escasos con sólo algunas colonias positivas. Si este ensayo de preparación de la biblioteca genómica se volviera a realizar, se utilizarían fragmentos de menor tamaño ya que sería más factible su inserción en un vector como pBluescript SK⁻ por ejemplo, de 2 a 3×10^3 pares de bases.

La segunda estrategia consistió en comparar la secuencia de los fragmentos del ADN_c con las secuencias del genoma de *D. hansenii* existentes en la base de secuencias Génolevures. Se logró tener la secuencia completa de cada uno de los seis fragmentos del ADN_c, y por comparación mediante el programa BLASTX se determinó su posible función celular. Luego, con oligonucleótidos de anclaje específico de cada gen y con el ADN_{genómico} de *D. hansenii* se obtuvieron seis productos de PCR con un tamaño similar al estimado. Una vez obtenida la secuencia de cada gen se confirmó la validez de los resultados del despliegue diferencial, y se prefirió hacerlo con los cromosomas de *D. hansenii* porque adicionalmente se tendría la localización de cada gen en los cromosomas y se podría comparar con la posición establecida en la base de secuencias Génolevures. Nuevamente hubo dificultades en la aplicación de la metodología, porque al aplicar el protocolo de extracción de cromosomas de *S. cerevisiae* a *D.*

hansenii se degradaron sus cromosomas. El problema se resolvió utilizando el protocolo de extracción de cromosomas de *Yarrowia lipolytica*, con el cual sí se observaron los cromosomas de *D. hansenii* bien definidos. Una de las principales diferencias entre ambos protocolos radica en la composición del amortiguador inicial para el rompimiento de la pared celular, ya que en *Y. lipolytica* hay condiciones de mayor inhibición de las enzimas de degradación como proteasas o endonucleasas; es decir, tiene una mayor concentración de EDTA (100 mM) y Tris/HCl con un valor de pH de 8, mientras que el amortiguador inicial de rompimiento celular de *S. cerevisiae* está compuesto de EDTA (20 mM) y citrato de sodio-fosfato con un valor de pH de 6, probablemente en las condiciones del amortiguador para *S. cerevisiae*, aplicado a *D. hansenii* no se logra la desactivación de enzimas de degradación intracelular.

Con la hibridización positiva de los genes en los cromosomas de *D. hansenii* y la ubicación de cinco de los genes, se confirmó que los fragmentos del ADN_c obtenidos con la técnica del despliegue diferencial provenían de ADN_{genómico} y que se encuentran como copia única, ya que sólo presentaron una posición en los cromosomas de *D. hansenii*, además de coincidir con la posición anotada en la base de datos Génolevures. En la revalidación del aumento del transcripto de los seis genes encontrados, se halló que sólo los transcriptos de los genes *ARO4* y *eIF4-4F* aumentaron en presencia de NaCl y KCl 2M, los transcriptos de los genes de la GTP-hidrolasa, *MER1* y *CBK1* no aumentaron en ninguno de los tratamientos. Respecto al ARN_{mensajero} de *GAP1* los resultados no fueron concluyentes porque en los ensayos de Northern blot se observaron hasta tres bandas de hibridización, probablemente productos no específicos de hibridización o isogenes.

Fue importante repetir los ensayos de Northern blot para el gen *GAP1*, ya que las bandas observadas en el primer Northern blot podrían corresponder a cualquiera de los cinco isogenes de *GAP1* (que codifica para una permeasa general de amino ácidos) que están registrados en el banco de secuencias Génolevures; esto resultó de interés, porque *D. hansenii* es una levadura cuyo sustrato principal de crecimiento son los hidrolizados de proteínas (Hertogh *et al.*,

2005); por tanto, se consideró importante investigar cuál de los isogenes de *GAP1* respondía al estrés salino. Sin embargo, en la segunda evaluación del transcrito de *GAP1*, no se observó el aumento en el tratamiento por NaCl 2 M, pero sí en el tratamiento con KCl 2 M, pero el resultado no se valoró como significativo ya que sólo aumento en una de las repeticiones (1.9 veces con respecto al control).

No se halló una relación directa entre los genes obtenidos y los descritos como genes de respuesta a estrés o choque salino y surgió la interrogante sobre la participación que tienen los genes producto del despliegue diferencial en la respuesta a un estrés salino, si son genes involucrados en la síntesis de aminoácidos aromáticos (*ARO4*), en la traducción de mRNAs (*eIF4*) y en el transporte de aminoácidos (*GAP1*). Con esta pregunta en mente, se decidió corroborar la función del gen *DhARO4* en condiciones de estrés por falta de aminoácidos, mediante la complementación de la función de Aro4p en la mutante *aro4Δ* de *S. cerevisiae*. Los genes *ARO4* y *ARO3* de *S. cerevisiae* codifican para la enzima 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintetasa (DHAP), que cataliza la primera reacción de la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos (Schnappauf *et al.*, 1998; Braus 1991), esta reacción consiste en la condensación del azúcar eritrosa-4-fosfato y fosfoenol-piruvato para formar 3-deoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato. La diferencia entre ambas enzimas es su inhibición específica por producto de aminoácidos aromáticos, Aro4p es inhibida por tirosina (DHAP^{Tyr}) y Aro3p por fenilalanina (DAHP^{Phe}) (Braus, 1991; Hinnebusch, 1992; Sousa *et al.*, 2002; Hartmann *et al.*, 2003; Helmstaedt *et al.*, 2005). Se midió la actividad enzimática de la DHAP^{Tyr} que codifica *ARO4* y se encontró que efectivamente la DAHP^{Tyr} sintasa de *D. hansenii* en la mutante *aro4Δ* de *S. cerevisiae* restablece los valores de actividad enzimática de la cepa silvestre (Tabla III). Adicionalmente, el fenotipo de crecimiento de la mutante transformada con *DhARO4* en medio mínimo y con un exceso de fenilalanina presentó el mismo crecimiento que la cepa silvestre de *S. cerevisiae* (Fig 18A), mientras que las mutantes sin transformar o transformadas con plásmido vacío tuvieron un crecimiento retardado como resultado de la presencia de la isoenzima DAHP^{Phe} (Aro3p) y en presencia de un exceso de fenilalanina y tirosina no hubo crecimiento

en la cepa silvestre, ni en las mutantes *aro4Δ* sin transformar y transformadas con *DhARO4*, debido a la inhibición de las enzimas Aro3p y Aro4p de acuerdo con los resultados en la mutante doble *aro3Δ/aro4Δ* de *S. cerevisiae* (Sousa *et al.*, 2002).

En el análisis de la región promotora de *DhARO4* se encontraron dos secuencias GCRC de unión a Gcn4p que sólo difieren en una base a la secuencia GCRC de *S. cerevisiae* (Kunzler *et al.*, 1992; Sousa *et al.*, 2002), y hasta en dos bases con las secuencias GCRC de *C. albicans* (Sousa *et al.*, 2002). También se localizaron tres secuencias de regulación asociadas a la respuesta a estrés hiperosmótico como el elemento CRE, que en *HAL1 S. cerevisiae* puede ser el sitio de unión para Gcn4p o Sko1p (Pascual-Ahuir *et al.*, 2001). El que la región promotora de *DhARO4* cuente con estos sitios de regulación conduce a proponer que *DhARO4* responde a un estrés por falta de aminoácidos vía sus dos sitios GCRC, y dado que el gen fue aislado en condiciones de un estrés salino es probable que la respuesta se de a través de sus sitios CRE.

Ya que *DhARO4* presentó sitios GCRC de unión a Gcn4p en su región promotora, se evaluó su respuesta transcripcional ante un estrés por falta de aminoácidos y se encontró que el transcripto de *DhARO4* aumentó 2.5 veces con respecto al control, aumento similar al observado con el efecto por estrés salino (2 veces con respecto al control). Con estos datos sólo se podía especular que la respuesta de *DhARO4* era la misma para los dos tipos de estrés y probablemente solo vía Gcn4p, es decir una respuesta general al efecto de un estrés salino por NaCl. Norbeck *et al.* (1998) determinaron que en *S. cerevisiae* expuesta a un choque por NaCl 0.7 M, hay una inhibición general del transporte de aminoácidos, que probablemente la célula registre como una falta de aminoácidos y por ello se dé la activación, no sólo de los genes de respuesta a estrés salino, sino también de los genes de la síntesis de aminoácidos. Por su parte Uesono y Toh-e (2002), encontraron que en *S. cerevisiae* después de estrés por NaCl 1 M, se inhibe el transporte de metionina de forma irreversible y el transporte de uracilo temporalmente. Estos autores indican que la inhibición irreversible del transporte de metionina podría provocar un retraso en el crecimiento, debido a la falta de nutrientes para el crecimiento de la célula.

Considerando lo anterior se analizó la expresión de *DhARO4* ante los dos tipos de estrés. En el tratamiento del efecto combinado de estrés salino y de ayuno por aminoácidos se encontró que el transcripto de *DhARO4* aumentó 5 veces con respecto al control (Fig 19). Este resultado indica que *DhARO4* responde de forma independiente a cada tipo de estrés. Esta respuesta aditiva ante el efecto combinado de dos factores de tensión o “estresores” ha sido reportada con anterioridad, por ejemplo en el gen *HXT1* en presencia de glucosa y estrés osmótico (Tomás-Cobos *et al.*, 2004). Así mismo, en la evaluación de la expresión genética de *S. cerevisiae* en condiciones de estrés térmico y osmótico moderado Gasch *et al.* (2000) observaron un efecto aditivo en la expresión de genes, y estimaron que la respuesta individual a cada factor de tensión (“estresor”) o de aditividad en presencia de dos de ellos indica que la célula puede ajustar su respuesta celular a diferentes condiciones ambientales. Entonces, se podría especular que la activación de *DhARO4* en el estrés combinado de sodio y 3AT se da por la presencia de sus sitios GCRE y CRE, es decir, que estarían participando Gcn4p y Sko1p respectivamente. Otra posibilidad sería que la activación de *DhARO4* sea debida solamente a Gcn4p en los dos sitios GCRE. Se ha demostrado que el gen *MET11* de *S. cerevisiae*, puede ser activado por Gcn4p no sólo en un ayuno de aminoácidos, sino también después de choque salino (Todeschini *et al.*, 2006); o que la activación vía Gcn4p puede estimularse por coactivadores, como el complejo Cyc8/Tup1, Kim *et al.* (2005) observaron que en la región promotora de los genes *ARG1* y *ARG4* la unión de Gcn4p aumenta por la presencia del factor Cyc8p, y en menor grado por la presencia de Tup1p. Aunque la evidencia en *S. cerevisiae* sugiere que la inhibición del transporte de aminoácidos sea un efecto del aumento de la salinidad del medio, en *D. hansenii* no se puede asegurar que el efecto sea el mismo y que la activación de *DhARO4* sólo sea mediante la vía GCN4. Por ello, aún faltaría por definir en un trabajo posterior cuál de los dos tipos de regulación es el que funciona para *DhARO4*.

En la serie de tiempo de 27 horas para evaluar los cambios del ARN_{mensajero} de *DhARO4* después de un choque salino por NaCl 2 M, se encontró que inicialmente el transcripto de *DhARO4* disminuye 0.5 veces con respecto al control

y después de tres horas aumenta hasta un nivel basal (como en la condición control), y sólo hasta que *D. hansenii* alcanza la fase de crecimiento exponencial el ARN_m de *DhARO4* aumenta hasta un valor de 2.6 veces con respecto al control (Fig 20). Con lo anterior se puede concluir que *DhARO4* no es un gen de respuesta inmediata a un cambio en la salinidad del medio y que su expresión aumenta una vez que la célula se adaptó a las condiciones de salinidad en el medio. En *S. cerevisiae* se ha determinado que la respuesta transcripcional a un choque salino está programada de tal forma que hay genes de respuesta inmediata o genes que sólo son activados una vez que la célula salió de la fase lag o genes que pueden ser sólo de mantenimiento celular (Gasch *et al.*, 2000) que podría ser el caso de *DhARO4*.

Siendo *ARO4* un gen que participa en la síntesis de aminoácidos aromáticos que en *S. cerevisiae* está regulado por un exceso de tirosina, habría que determinar cuál es el papel fisiológico de este gen en *D. hansenii* creciendo en un medio hipersalino, para lo que se debe explorar si la tirosina participa directamente en la respuesta al estrés salino. Existen algunos trabajos sobre el posible papel de la tirosina como protector celular contra el estrés oxidativo (Lupo *et al.*, 1997); Moosmann y Behl (2000) determinaron en diferentes tipos de membranas que la tirosina y el triptofano tienen un efecto antioxidante para la célula, y proponen que la protección de ambos aminoácidos se deba a que puedan ser convertidos a compuestos radicales de baja reactividad. En este contexto es importante resaltar que en una estimación de la evaluación de la actividad de la DAHP^{Tyr} de *D. hansenii* y de *S. cerevisiae* en un medio sin sales se encontró que la actividad de la DAHP^{Tyr} de *D. hansenii* es 5 veces mayor a la de *S. cerevisiae* (Anexo 1) y diez veces mayor en presencia de NaCl 1 M; por ello se debería evaluar si hay un aumento en la concentración de tirosina cuando *D. hansenii* crece en presencia de NaCl 1 y 2 M, que sugeriría que la tirosina en *D. hansenii* es un protector celular en condiciones de estrés hipersalino. Si se determina que la concentración intracelular de tirosina no aumenta, se reforzaría la propuesta de que la actividad y la expresión de algunas enzimas del metabolismo central como *DhGdh1p* aumentan durante estrés salino para evitar el efecto de

inhibición del sodio sin que aumente la concentración de glutamato (Alba-Lois *et al.*, 2004; Guerrero *et al.*, 2005), y que probablemente el gen *DhARO4* de la síntesis de aminoácidos aromáticos es un blanco de regulación durante estrés salino como ocurre para el gen *ARO7* de *S.cerevisiae* (Ball *et al.*, 1986).

En términos generales con la información anterior se refuerza la relevancia de llevar a cabo mas estudios en la levadura marina *D. hansenii* porque efectivamente presenta diferencias en la respuesta general de osmo-regulación con respecto a la levadura *S. cerevisiae*.

7. CONCLUSIONES

La técnica del despliegue diferencial aplicada a *D. hansenii* con tres oligonucleótidos de anclaje de ARN_{mensajero} produjo resultados insuficientes. La visualización de fragmentos del ADN_c mediante un marcaje radioactivo con ³⁵S permitió observar 30 bandas y con una tinción de nitrato de plata se distinguieron alrededor de 40 bandas de ADN_c. En total se obtuvieron siete bandas del ADN_c con un cambio notorio de concentración con tratamiento de NaCl 2 M.

Mediante comparación de las secuencias de cada ADN_c con el banco de secuencias Génolevures, se obtuvo la secuencia completa de seis genes, que corresponden a *ARO4*, *CBK1*, *MER1* y *eIF4-F* de *S. cerevisiae*, a la GTPhidrolasa1 de *S. pombe* y a *GAP1* de *C. albicans*.

La hibridización positiva de cada gen en los cromosomas de *D. hansenii* demostró que tienen la misma posición que la registrada en el genoma de *D. hansenii* en el banco de secuencias Génolevures, excepto el gen de la GTP-hidrolasa1 que encontramos en el cromosoma "E" y en la base de datos Génolevures esta registrado en el cromosoma "G" (DEHA0G10329g).

En la hibridización por Northern blot se encontró que sólo los genes *ARO4* y *eIF4-F* presentan un aumento real del su transcripto en las condiciones de NaCl 2 M. Los otros cuatro son productos denominados falsos positivos inherentes de la técnica del despliegue diferencial.

DhARO4 es el ortólogo funcional de *ScARO4*, ya que en el ensayo de complementación de la función de la mutante nula *Aro4Δ* de *S. cerevisiae*, la mutante *aro4Δ* transformada con *DhARO4* presentó el mismo crecimiento que la cepa silvestre *S. cerevisiae* en presencia de fenilalanina (5 mM) y porque al medir la actividad específica de la DHAP^{Tyr} en la mutante transformada con *DhARO4*, esta presentó el mismo valor de la DHAP^{Tyr} de 0.092 U·mg⁻¹ de la cepa silvestre de *S. cerevisiae*.

La región promotora de *DhARO4* tiene dos sitios GCRE de probable unión al factor de regulación Gcn4p que activa diversos genes de respuesta a estrés por falta de aminoácidos, y tres sitios CRE de posible unión al factor de transcripción Sko1p que participa en la represión y/o activación de genes de respuesta a estrés osmótico.

El transcripto de *DhARO4* en el estrés por 3AT aumentó 2.5 veces respecto del control, en el estrés salino aumento 2 veces con respecto a un control sin sales; y en el efecto combinado de los dos tipos de estrés el aumento fue de 5 veces con respecto al control, este aumento podría deberse a una doble regulación transcripcional independiente de los sitios GCRE y CRE de *DhARO4*, o podría ser el efecto aditivo de una regulación dependiente únicamente de los sitios de GCRE vía Gcn4p, que podría además estar influenciada por coactivadores que promueven la unión de Gcn4p a todos los sitios de unión GCRE.

En la serie de tiempo de 27 horas para el análisis del cambio en la expresión del transcripto de *DhARO4* de *D. hansenii* después de un choque salino con NaCl 2 M, se encontró que el transcripto disminuye en las primeras horas y una vez que se inicia la fase crecimiento exponencial (15 horas después del choque salino) el transcripto aumenta hasta 2.6 veces con respecto al control.

En la determinación de la actividad enzimática de la DHAP^{Tyr} en la condición del estrés salino por NaCl 1M, se encontró que la de *D. hansenii* es 10 veces mayor a la de *S. cerevisiae*. La actividad enzimática de la DHAP^{Tyr} de *D. hansenii* es mayor al aumentar la concentración de sodio en el medio.

En general se considera que *DhARO4* es un gen de mantenimiento celular que responde a estrés hipersalino por un aumento en su expresión y por la actividad enzimática de la DAHP^{Tyr} para la cual codifica.

ANEXO 1

Tabla V. Valores de la actividad enzimática de la DAHP^{Tir} sintetasa en la cepas silvestre de *S. cerevisiae* y *D. hansenii*

Cepa	Densidad óptica (600 nm) ^a	Actividad específica de DHAP ^{Tir} (unidades/mg) ^b
<i>S. cerevisiae</i>	0.94	0.01
<i>S. cerevisiae</i> (NaCl 1 M)	0.93	0.05
<i>D. hansenii</i>	0.93	0.28
<i>D. hansenii</i> (NaCl 1 M)	0.97	0.36

^a Densidad óptica del cultivo al momento de colectar las células.

^b Actividad específica en unidades por mg de proteína total. La medida se hizo en extractos crudos de células crecidas en medio MM galactosa con fenilalanina 5 mM. Cada valor de actividad específica es representativo de tres experimentos independientes.

8. BIBLIOGRAFIA

Abebe T, Guenzi AC, Martin B, y Cushman JC. 2003. Tolerance of Mannitol-Accumulating Transgenic Wheat to Water Stress and Salinity. *Plant Physiol.* **131**:1748–1755.

Adler L, Blomberg A, y Nilsson A. 1985. Glycerol Metabolism and Osmoregulation in the Salt-Tolerant Yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Bacteriol.* **162** (1): 300-306.

Aggarwal M, Bansal PK, y Mondal AK. 2005. Molecular cloning and biochemical characterization of a 3'(2'),5' biphosphate nucleotidase from *Debaryomyces hansenii*. *Yeast.* **22**(6):457-470.

Alba-Lois L, Segal C, Rodarte B, Valdes-Lopez V, DeLuna A, y Cardenas R. 2004. NADP-glutamate dehydrogenase activity is increased under hyperosmotic conditions in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Curr. Microbiol.* **48**(1): 68-72.

Ali M, Markham AF, y Isaacs JD. 2001. Application of differential display to immunological research. *J. Immunol. Meth.* **250** 29–43

Almagro A, Prista C, Benito B, Loureiro-Dias MC, y 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, y Adler L. 1988. The role of glycerol of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 669-677.

Azam F. y Worden AZ. 2004. Microbes, Molecules, and Marine Ecosystems. *Science* 303:1622-1624.

Bansal PK, y Mondal AK. 2000. Isolation and sequence of the HOG1 homologue from *Debaryomyces hansenii* by complementation of the *hog1Δ* strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**(1): 81-8.

Ball SG, Wickner RB, Cottarel G, Schaus M, y Tirtiaux C. 1986. Molecular cloning and characterization of ARO7-OSM2, a single yeast gene necessary for chorismate mutase activity and growth in hypertonic mediu. *Mol Gen Genet* **205**(2):326-330.

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

Bolumar T, Sanz Y, Aristoy M-C y Tolera F. 2005. Protease B from *Debaryomyces hansenii*: purification and biochemical properties. *Int. J. Food Microbiol.* **98**: 167–177.

Braus, GH. 1991. Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **55**: 349-370.

- Brown AD, y Simpson J. 1972. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.* **72**: 589– 591.
- Bull AT, Ward AC, y Goodfellow M. 2000. Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**(3):573-606.
- Burg B VD. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr. Op. Microbiol.* **6**:213–218.
- Burke RM, y Jennings DH. 1990. Effect of sodium chloride on growth characteristics of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* in batch and continuous culture under carbon and potassium limitation. *Mycol. Res.* **94**:378-388.
- Casarégola S, Feynerol C, Diez M, Fournier P, y Gaillardin C. 1997 Genomic organization of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Chromosoma* **106**:380-390.
- Catalano RD, Vlad M, y Kennedy RC. 1997. Differential display to identify and isolate novel genes expressed during spermatogenesis. *Mol. Human Repr.* **3**:215-221.
- Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, y Young RA. 2001. Remodeling of Yeast Genome Expression in Response to Environmental Changes. *Mol. Biol. Cell.* **12**:323-337.
- Corredor-Rodríguez M, 2000. Diversité génétique, constitution chromosomique et expression génétique chez la levure fromagère halotolérante *Debaryomyces hansenii*. Thèse doctorale. Université Paris-Sud U.F.R. Scientifique D'Orsay. France.
- Csonka LN. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **53**: 121 - 147.
- De Hertog B, Hancy F, Goffeau A y Baret P. 2006. Emergence of Species-Specific Transporters During Evolution of the Hemiascomycete Phylum. *Genetics* **172**:771–781
- Donohue PJ, Alberts GF, Gou Y, y Winkles JA. 1995. Identification by Targeted Differential Display of an Immediate Early Gene Encoding a Putative Serine/Threonine Kinase. *J. Biol. Chem.* **270**:10351-10357.
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neuveglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisrame A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, De Daruvar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekaia F, Wesolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, y Souciet JL. 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**(6995):35-44.

Garcia-Gimeno MA, y Strhul K. 2000. Aca1 and Aca2, ATF/CREB activators in *Saccharomyces cerevisiae*, are important for carbon source utilization but not for the response to stress. *Mol. Cell. Biol.* **20**:4340-4349.

Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, y Brown PO. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell.* **11**:4241-4257.

Gietz D, St. Jean A, Woods RA, y Schiestl RH. 1992 Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acid Res* **20**:1425.

González-Hernández JC, Cárdenas-Monroy CA, y Peña A. 2004 Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **21**:403–412.

Grundmann O, Mösch H-U, y Braus GH. 2001. Repression of *GCN4* mRNA translation by nitrogen starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**:25661-25671.

Guerrero CA, Aranda C, De Luna A, Filetici P, Riego L, Anaya VH, y González, A. 2005. Salt-dependent expression of ammonium assimilation genes in the halotolerant yeast, *Debaryomyces hansenii*. *Curr. Genet.* **47**:163–171

Gunde-Cimerman N, Zalar P, de Hoog S, y Plemenitas A. 2000 Hypersaline waters in salterns-natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**:235-240.

Gupta R. 1996. Growth of marine yeast on different strength of stress solutes. *Proc Second Workshop Scient Resul FORV* 91-95.

Gustafsson L, y Norkrans B. 1976. On the mechanism of salt tolerance. Production of glycerol and heat during growth of *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiol.* **110**:177-83.

Hartmann M, Schneider TR, Pfeil A, Heinrich G, Lipscomb WN, y Braus GH. 2003. Evolution of feedback-inhibited β/α barrel isoenzymes by gene duplication and a single mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 862–867.

Helmstaedt K, Strittmatter A, y Lipscomb WN, y Braus GH. 2005. Evolution of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase-encoding genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 9784–9789.

Hernández-Saavedra NY, Ochoa JL y Vazquez-Dulhalt. 1995. Osmotic adjustment in marine yeast. *J. Plankton Res.* **17**:55-59.

Hinnebusch AG. 1992. General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. En *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression*, Broach JR, Jones EW, Pringle JR (eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY; 319–414.

- Hinnebusch AG, y Natarajan K. 2002. Gcn4p, a Master Regulator of Gene Expression, Is Controlled at Multiple Levels by Diverse Signals of Starvation and Stress. *Eucaryot. Cell.* **1**:22-32.
- Hobot JA, y Jennings DH. 1981. Growth of *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to pH and salinity. *Exp. Mycol.* **5**:217-228.
- Hohmann S. 2002. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:300-372.
- Hyun JH, Choi JK, Chung KH, Yang EJ, y Kim MK. 1999. Tidally Induced Changes in Bacterial Growth and Viability in the Macrotidal Han River Estuary, Yellow Sea. *Est. Coast. Shelf Sci.* **48**:143–153.
- Igual JC, Y Estruch F. 2000. Signalling Stress in Yeast. *Food technol. biotechnol.* **38**:263-276.
- Kaartokallio H, Laamanen M, y Sivonen K. 2005. Responses of Baltic Sea Ice and Open-Water Natural Bacterial Communities to Salinity Change. *Appl. Envir. Microbiol.* **71**:4364-4371.
- Kim SJ, Swanson MJ, Qiu H, Govind CK, y Hinnebusch AG. 2005. Activator Gcn4p and Cyc8p/Tup1p are interdependent for promoter occupancy at *ARG1* in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **25**:11171-83.
- Kogej T, Ramos J, Plemenitas A, y Gunde-Cimerman N. 2005. The halophilic fungus *Hortaea werneckii* and the halotolerant fungus *Aureobasidium pullulans* maintain low intracellular cation concentrations in hypersaline environments. *Appl. Envir. Microbiol.* **71**:6600-6605.
- Kreyer-van Rij NJW. 1984. The yeasts: a taxonomic study, 3rd ed., Elsevier Science Publisher, Amsterdam.
- Kumura H, Tanoue Y, Tsukahara M, Tanaka T, y Shimazaki K. 2002. Screening of Dairy Yeast Strains for Probiotic Applications. *J. Dairy Sci.* **87**:4050–4056.
- Kumura H, Takagaki K, Sone T, Tsukahara M, Tanaka T, y Shimazaki K. 2002. Casein digestion by *Debaryomyces hansenii* isolated from Cheese. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**:1370-1373.
- Künzler M, Paravicini G, Egli CM, Irniger S, y Braus GH. 1992. Cloning, primary structure and regulation of the *ARO4* gene, encoding the tyrosine-inhibited 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **113**:67-74.
- Lang F, Busch GL, Ritter M, Völkl H, Waldegger S, Gulbins E, y Häussinger D. 1998. Functional Significance of Cell Volume Regulatory Mechanisms. *Physiol. Rev.* **78**:248-273.
- Larsson C, Morales C, Gustafsson L, y Adler L. 1990. Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *J. Bacteriol.* **172**:1769 -1774.

- Leclercq-Perlat MN, Corrieu G, y Spinnler HE. 2004. The Color of *Brevibacterium linens* Depends on the Yeast Used for Cheese Deacidification. *J. Dairy Sci.* **87**:1536–1544.
- Liang P, y Pardee AB. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**:967-971.
- Liang P, y Pardee AB. 1995. Recent advances in differential display. *Curr. Op. Immunol.* **7**:274-280.
- Liang P, y Pardee AB. 1997. Differential display. A general protocol. *Meth. Mol. Biol.* **85**:3-11.
- Lievens S, Goormachtig S, y Holsters M. 2001. A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation: locking back and locking forward. *Nucleic Acid Res.* **29**:3459-3468.
- Lucas C, Da Costa M, y Van Uden N. 1990. Osmoregulatory active sodium-glycerol cotransport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **6**:187-191.
- Lupo S, Aranda C, Miranda-Ham L, Olivera H, Riego L, Servin L, y González A. 1997. Tyrosine is involved in protection from oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* **43**:963-970.
- Luquet CM, Weihrauch D, Senek M, y Towle W. 2005. Induction of branchial ion transporter mRNA expression during acclimation to salinity change in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. *J. Exp. Biol.* **208**:3627-3636.
- Martin DD, Ciulla RA, y Roberts MF. 1999. Osmoadaptation in Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1815–1825.
- Miura S, Zou W, Ueda M y Tanaka A. 2000. Screening of Genes Involved in Isooctane Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by Using mRNA Differential Display. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4883-4889.
- Moosmann B, y Behl C. 2000. Cytoprotective antioxidant function of tyrosine and tryptophan residues in transmembrane proteins. *Eur. J. Biochem.* **267**:5687-5692.
- Mong JA, Krebs C, y Pfaff DW. 2002. Perspective: Micoarrays and Differential Display PCR-Tools for Studying Transcript Levels of Genes in Neuroendocrine Systems. *Endocrinol.* **143**:2002–2006.
- Murgía JR, Bellés JM, y Serrano R. 1996. The Yeast *HAL2* Nucleotidase Is an *in Vivo* Target of Salt Toxicity. *J. Biol. Chem.* **271**:29029–29033.
- Natarajan K, Meyer MR, Jackson BM, Slade D, Roberts C, Hinnebusch AG, y Marton MJ. 2001. Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **21**:4347-4368
- Neves ML, Oliveira RP, y Lucas CM. 1997. Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiol.* **143**:1133-1139.

- Norbeck J, y Blomberg A. 1998. Amino acid uptake is strongly affected during exponential growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 0.7 M NaCl medium. *FEMS Microbiol Lett.* **158**:121-126.
- Norkrans B. 1966. Studies on marine occurring yeast: growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Arch. Microbiol.* **54**:374-392.
- Norkrans B. 1968. Studies on marine occurring yeasts: respiration, fermentation and salt tolerance. *Arch. Microbiol.* **62**:358-372.
- Norkrans B, y Kylin A. 1969. Regulation of the Potassium to Sodium Ratio and of the Osmotic Potential in Relation to Salt Tolerance in Yeasts. *J. Bacteriol.* **100**:836 – 845.
- Pascual-Ahuir A, Serrano R, y Proft M. 2001. The Sko1p repressor and Gcn4p activator antagonistically modulate stress-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **21**:16-25.
- Pflüger K, y Müller V. 2004. Transport of Compatible Solutes in Extremophiles. *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**:17-24.
- Posas F, Chambers JR, Heyman JA, Hoeffler P, de Nadal E, y Ariño J. 2000. Genomics, Proteomics, and Bioinformatics: The transcriptional Response of Yeast to Saline Stress. *J. Biol. Chem.* **275**: 17249-17255.
- Prista C, Almagro A, Loureiro-Dias MC, y Ramos J. 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl. Envir. Microbiol.* **63**:4005-4009.
- Proft M, Pascual-Ahuir A, de Nadal E, Ariño J, Serrano R, y Posas F. 2001. Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J.* **20**:1123-1133.
- Rep M, Krantz M, Thevelein JM, y Hohmann S. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. *J. Biol. Chem.* **275**:8290-8300.
- Rosen KM, Lamperti ED, y Villa-Komaroff L. 1990. Optimizing the northern blot procedure. *Biotechniques* **8**: 398–403.
- Sambrook J., Fritsch E. F. y Maniatis T. Molecular Cloning. Vol 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 1989
- Sanan-Mishra N, Pham XH, Sopory SK, y Tuteja N. 2004. Pea DNA helicase 45 overexpression in tobacco confers high salinity tolerance without affecting yield. *Proc. Natl. Acad Sci USA* **102**:509–514.
- Sanford E. 2002. Water Temperature, Predation, and the Neglected Role of Physiological Rate Effects in Rocky Intertidal Communities. *Integr. Comp. Biol.* **42**:881 - 891.
- Schmitt ME, Brown TA, y Trumpower BL. 1990. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acid Res.* **18**:3091-3092.

- Schnappauf G, Hartmann M, Kunzler M y Braus GH. 1998. The two 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase isoenzymes from *Saccharomyces cerevisiae* show different kinetic modes of inhibition. *Arch Microbiol.* **169**(6): 517-24.
- Sharma P, Meena N, Aggarwal M, y Mondal AK. 2005. *Debaryomyces hansenii*, a highly osmo-tolerant and halo-tolerant yeast, maintains activated Dhog1p in the cytoplasm during its growth under severe osmotic stress. *Curr. Genet.* **48**:162–170.
- Somero GN. 2002. Thermal Physiology and Vertical Zonation of Intertidal Animals: Optima, Limits, and Costs of Living. *Integr. Comp. Biol.* **42**:780-789.
- Sousa S, McLaughlin MM, Pereira SA, VanHorn S, Knowlton R, Brown JR, Nicholas RO, y Livi GP. 2002. The *ARO4* gene of *Candida albicans* encodes a tyrosine sensitive DAHP synthase: evolution, functional conservation and phenotype of Aro3p-, Aro4p-deficient mutants. *Microbiol.* **148**:1291-1303.
- Springer C, Valerius O, Strittmatter A, y Braus GH. 1997. The Adjacent Yeast Genes *ARO4* and *HIS7* Carry No Intergenic Region. *J. Biol. Chem.* **272**:26318-26324.
- Spurgeon SL, y Matchett WH. 1977. Inhibition of Aminoacyl-Transfer Ribonucleic Acid Synthetases and the Regulation of Amino Acid Biosynthetic Enzymes in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **129**:1303-1312.
- Sturtevant, J. 2000. Applications of Differential-Display Reverse Transcription-PCR to Molecular Pathogenesis and Medical Mycology. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**:408-427.
- Subramaniam PS, Xie G, Xia T, y Jensen RA. 1998. Substrate ambiguity of 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase from *Neisseria gonorrhoeae* in the context of its membership in a protein family containing a subset of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthases. *J. Bacteriol.* **180**:119-127.
- Takahashi M, y Chan WW. 1971. Separation and properties of isozymes of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Biochem.* **49**:1015-1025.
- Todeschini AL, Condon C, y Bernard L. 2006. Sodium-induced *GCN4* expression controls the accumulation of the 5' to 3' RNA degradation inhibitor, 3'-phosphoadenosine 5-phosphate. *J. Biol. Chem.* **281**:3276–3282.
- Tomás-Cobos L, Casadomé L, Mas G, Sanz P, y Posas F. 2004. Expression of the *HXT1* low affinity glucose transporter requires the coordinated activities of the HOG and glucose signalling pathways. *J. Biol. Chem.* **279**:22010-22019.
- Thomas DN, y Dieckmann GS. 2002. Antarctic Sea Ice--a Habitat for Extremophiles. *Science* **295**:641-644.
- Thomé-Ortiz PE, Peña A, y Ramírez J. 1998. Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentration of KCl and NaCl. *Yeast* **14**:1355-1371.

-
- Thomé PE, y 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.
- Thomé PE. 2004. Isolation of a GPD gene from *Debaryomyces hansenii* encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). *Yeast* **21**:119-126.
- Uesono Y, y Toh-e A. 2002. Transient Inhibition of Translation Initiation by Osmotic Stress. *J. Biol. Chem.* **277**:13848–13855.
- Velkova K, y Sychrova H. 2006. The *Debaryomyces hansenii* NHA1 gene encodes a plasma membrane alkali-metal-cation antiporter with broad substrate specificity. *Gene* **369**:27-34.
- Veziñhet F, Blondin B, y Hallet J. (1990). Chromosomal DNA pattern and mitochondrial DNA polymorphism for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 568-571.
- Welthagen JJ, y Viljoen BC. 1998. Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. *Int. J. Food Microbiol.* **41**:185–194.
- Yale J, y Bohnert J. 2001. Genomics, Proteomics, and Bioinformatics: Transcript Expression in *Saccharomyces cerevisiae* at High Salinity. *J. Biol. Chem.* **276**:15996-16007.
- Yancey PH. 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* **208**:2819-2830.
- Zhu H, Cong JP y Shenk T. 1997. Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: Induction of interferon-responsive RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:13985-13990.