

Universidad Nacional Autónoma de
México.

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Aislamiento de los genes de detoxificación del
compuesto oxidado 3-Nitrotirosina en la levadura
Debaryomyces hansenii.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

REQUENEZ-CONTRERAS JOSÉ LUIS

Directora de Tesis:

Dra: Claudia Marissa Calderón-Torres

Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2015.





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.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	3
Abreviaturas:	4
RESUMEN	5
Introducción.	7
Radicales libres	7
Estrés oxidante en enfermedades humanas	9
Nitrorreductasas.	13
<i>Debaryomyces hansenii</i> (Lodder & Kreger-van Rij, 1984).	15
Justificación	20
Hipótesis	20
OBJETIVOS	21
METODOLOGÍA	22
Curvas de crecimiento	22
Selección de genes	22
Extracción de ADN genómico.	23
Extracción de ARN	23
RT-PCR semicuantitativo y análisis densitométrico.	24
Resultados y discusión	27
Curvas de crecimiento con 3-NT	27
Selección de genes y RT-PCR.	30
Evaluación de la expresión genética utilizando transcripción inversa acoplada a una amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).	34
Conclusiones	43
Bibliografía.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cadena transportadora de electrones. _____	8
Figura 2. Formación del compuesto 3-NT. _____	10
Figura 3. Comparación de niveles 3-NT en ratas de diferentes edades. _____	11
Figura 4. Comparación de los niveles de 3-NT pacientes diabéticos y sanos. _____	12
Figura 5. Esquema de la detoxificación de 3-NT por la nitrorreductasa. _____	14
Figura 6. Microfotografía electrónica de células de <i>D. hansenii</i> . _____	15
Figura 7. Cuantificación de ERO en extractos celulares de <i>D. hansenii</i> . _____	16
Figura 8. Cuantificación de 3-NT en extractos celulares de <i>D. hansenii</i> expuesta a estrés salino. _____	17
Figura 9. Esquema del funcionamiento de los factores de transcripción. _____	19
Figura 10. Crecimiento de <i>D. hansenii</i> en MM+3NT y MM -3NT. _____	29
Figura 11. Esquema de la unión de los factores transcripcionales con la región promotora de cada uno de los genes seleccionados. _____	32
Figura 12. PCR de ADN genómico de los genes seleccionados. _____	33
Figura 13. Resultados de la estandarización de RT-PCR de los genes seleccionados. _____	35
Figura 14. Expresión de los genes seleccionados con función de óxido-reductasas mediante RT-PCR. _____	36
Figura 15. Comparación de la expresión de los genes de prueba con respecto al gen de actina. _____	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Condiciones de temperatura y tiempo de Retro transcripción. _____	25
Tabla II. Condiciones de temperatura y tiempo de PCR. _____	25
Tabla III. Nombre de los genes a evaluar con la técnica molecular de RT-PCR y su temperatura de hibridación estimada para obtener un producto con PCR. _____	25
Tabla IV. Secuencias de los oligonucleótidos de anclaje para cada gen seleccionado con la búsqueda in silico _____	26
Tabla V. Factores de transcripción usados para el análisis in silico. _____	30
Tabla VI. Genes obtenidos a partir de la búsqueda in silico. _____	31

Abreviaturas:

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
ATP	Adenosín trifosfato.
DO	Densidad óptica.
ERO	Especies reactivas de oxígeno.
ERN	Especies reactivas de nitrógeno.
FAD	Flavín adenin dinucleótido.
FMN	Flavín mononucleótido.
MM	Medio mínimo.
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido fosfato (reducido).
NADP⁺	Nicotín adenin dinucleótido fosfato (oxidado).
PCR	Por sus siglas en inglés “Polymerase Chain Reaction”.
RT	Retro-transcripción.
SOD	Speróxido dismutasa.
YPD	Por sus siglas en inglés “Yeast Peptone Dextrose”.
3-NT	3-Nitrotirosina.

RESUMEN

Durante algunas enfermedades crónicas degenerativas debido al daño y mal funcionamiento de organelos, es común desarrollar un estado de estrés oxidante, es decir, un desequilibrio entre la formación de especies reactivas y la de antioxidantes. Durante esta condición de estrés oxidante se ha reportado la presencia de una especie reactiva muy abundante, llamada peroxinitrito, capaz de reaccionar con la tirosina para formar 3-nitrotirosina (3-NT), sin que el organismo tenga la capacidad de metabolizarla. Este compuesto daña las proteínas y acelera el agravamiento de la enfermedad, por lo que nos parece importante buscar enzimas capaces de degradarlo sin dañar el aminoácido. Se han encontrado algunos organismos, sobre todo procariontes, capaces de degradar nitrocompuestos y usarlos para su desarrollo, esto con ayuda de proteínas de la familia flavin-monooxigenasa, denominadas nitrorreductasas. Estas enzimas han sido caracterizadas en diferentes procariontes, los cuales parecen conservar un método similar para la degradación de nitrocompuestos. Entre ellos encontramos a las bacterias *Burkholderia sp. JS165* y *Variovorax paradoxus JS171* que son capaces de usar a la 3-nitrotirosina como única fuente de nitrógeno. Sin embargo, debido a la lejanía filogenética sería difícil proponer las enzimas de estas bacterias como terapia; no obstante nos proporcionó antecedentes importantes en los mecanismos de degradación de estos nitrocompuestos, como el caso de una enzima única capaz de degradar la 3-NT. Nuestro grupo de trabajo propuso a la levadura *Debaryomyces hansenii* para la búsqueda de genes capaces de detoxificar este tipo de compuestos. *D. hansenii* es capaz de sintetizar tirosina como una respuesta antioxidante ante estrés de tipo salino u oxidante, debido a que la tirosina es rápidamente oxidada protegiendo a otras biomoléculas importantes del daño oxidante. Aunado a esto, se reportó que al agregar 3-NT a un medio de cultivo, *D. hansenii* tenía un mayor crecimiento, sugiriendo que es capaz de degradarla y asimilarla. Para comprobar que *D. hansenii* es capaz de usar la 3-NT como fuente de nitrógeno, se realizaron curvas de crecimiento en un medio que contenía 3-NT, se observó un crecimiento mayor en comparación con el grupo control, carente de fuente de nitrógeno. Estos resultados sugieren que *D. hansenii* es capaz de degradar y metabolizar la 3-NT. Posteriormente se eligieron algunos genes para poder identificar candidatos que estuvieran relacionados con la degradación de la 3-NT en *D. hansenii*, estos genes fueron seleccionados a través de una búsqueda *in silico*, escogiendo aquellos que tuvieran relación con 2 factores transcripcionales y poseyeran función de oxidorreductasas y flavo-adenin-monooxigenasas. Para evaluar la expresión de los 6 genes escogidos, *D. hansenii*, fue cultivada en

medios que provocaran estrés salino (YPD + NaCl 1M y 2M) además de un medio que tenía como única fuente de nitrógeno 3-NT. Se encontró que los genes DEHA2G08162g, DEHA2D17446g, DEHA2E24178g, DEHA2C0028g no mostraron una diferencia significativa en los niveles de expresión respecto al medio control Yeast Peptone Dextrose (YPD), sugiriendo que estos están involucrados en el mantenimiento de la homeostasis celular en *D. hansenii*. Mientras que los genes DEHA2C14784g y DEHA2C03036g mostraron un aumento significativo en los niveles de expresión en el medio con 3-NT, por lo que son buenos candidatos para continuar las investigaciones de la detoxificación de la 3-NT.

Introducción.

Radicales libres

Los radicales libres son átomos o moléculas caracterizados por tener al menos un electrón desapareado y capaces de existir independientemente de otras moléculas (de ahí el término libre). Estos se forman en su gran mayoría cuando un enlace covalente se rompe y los electrones permanecen uno en cada átomo, a esto se le conoce como fragmentación homolítica (Halliwell y Gutteridge, 2008). Por la disparidad de electrones los radicales libres se vuelven inestables y altamente reactivos; debido a esto tienden a captar un electrón de otros átomos para alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita se reduce, la molécula estable que lo pierde se oxida, convirtiéndose a su vez en un radical libre al quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena. Debido a que estos no poseen receptores específicos resultan ser altamente agresivos sobre las biomoléculas y pueden llegar a causar daños al organismo (Maldonado *et al.*, 2010).

Diferentes factores externos, como contaminantes en la atmosfera, la radiación solar, consumo de alimentos ricos en grasas o carbohidratos, incluso el oxígeno que respiramos, son responsables de la producción de radicales libres dentro de nuestro organismo de forma natural; como producto de nuestro metabolismo también se generan distintos tipos de especies reactivas, entre ellas, las más comunes son las de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN) (Maldonado *et al.*, 2010). Una de las principales fuentes de ERO es la mitocondria, conocida por ser la mayor fuente de energía en los eucariotas, produciendo ATP a través de la cadena transportadora de electrones. En ella el O₂ es usado como último aceptor de electrones re-oxidando los acarreadores NAD, FAD y FMN. El O₂ acepta un electrón y se produce el anión superóxido O₂^{•-} (García, 2012; Halliwell y Gutteridge, 2007).

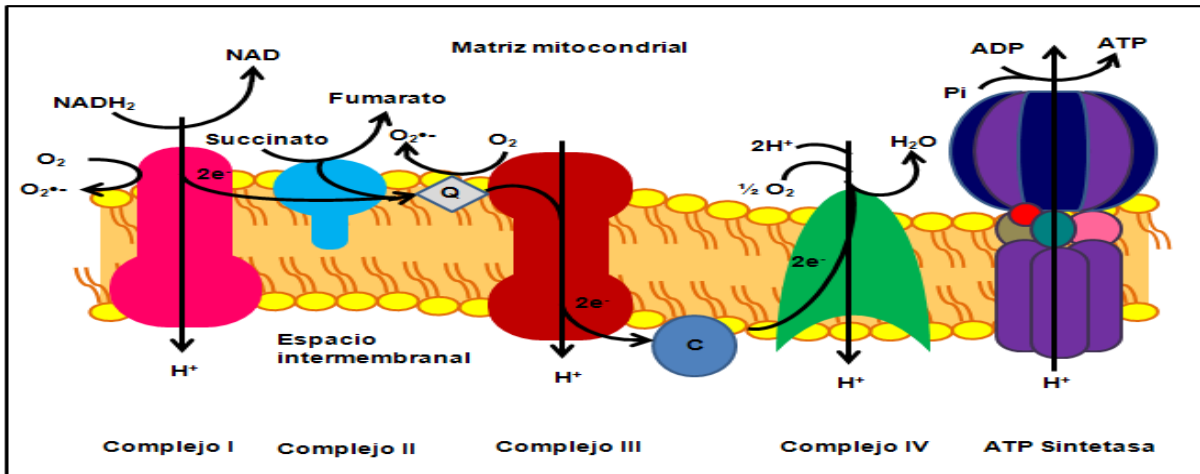


Figura 1. Cadena transportadora de electrones. Sitios que se han identificado como formadores del radical $O_2^{\bullet-}$: el complejo I y la interfase entre el ciclo Q y el complejo III (citada en García, 2012)

Uno de los mayores representantes de las ERN es el óxido nítrico (NO^{\bullet}) que funciona en nuestro organismo como un vaso dilatador y es producido a partir de la oxidación de la arginina por la sintasa de óxido nítrico (Kamat, 2006). A pesar de que los radicales NO^{\bullet} y $O_2^{\bullet-}$ son muy poco reactivos (Halliwell, 2001), juegan un papel importante en la formación de otras especies reactivas (García, 2012), como el anión peróxido, el radical hidroxilo, el peroxinitrito, entre otras (Maldonado *et al.*, 2010)

En condiciones normales, el organismo mantiene el balance de las especies reactivas con sistemas antioxidantes, estas sustancias ayudan a retrasar o prevenir significativamente la oxidación (Halliwell, 2001; Dröge, 2002). Los antioxidantes pueden provenir de la dieta, como las vitaminas E, C, D, y algunos aminoácidos. Por otra parte también hay enzimas sintetizadas por nuestro organismo como las superóxido dismutasas (SOD), catalasas y peroxidasas que ayudan al mantenimiento de la homeostasis de radicales libres (Dröge, 2002; Dorado *et al.*, 2003). Sin embargo, si la capacidad de control de los sistemas antioxidantes es superada por las especies reactivas, cambia el balance a favor de la oxidación, produciendo un estado al que se le denomina estrés oxidante, que

puede causar daño en diferentes biomoléculas, como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, causando a la larga un daño a células y al organismo (Maldonado *et al.*, 2010).

El estrés oxidante puede ser un resultado de:

1) La disminución de antioxidantes, ya sea por mutaciones, que disminuyan la expresión de los sistemas enzimáticos, así como por una falta de consumo de alimentos ricos en ellos.

2) El incremento de las especies reactivas, por una exposición elevada a O₂, la presencia de toxinas que produzcan especies reactivas o una formación inapropiada causada por enfermedades que afecten los sistemas naturales de nuestro cuerpo (cadena de transporte de electrones, peroxisomas) (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Estrés oxidante en enfermedades humanas.

Como ya se mencionó, existen diversos factores que pueden provocar un estado de estrés oxidante. Sin embargo, esta condición se ha asociado con cerca de 100 enfermedades humanas como un factor común que se desarrolla debido a los daños causados por el mismo padecimiento. El estado de estrés oxidante se vuelve relevante ya que se relaciona con el agravamiento de la enfermedad (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Dentro de estos padecimientos destacan enfermedades como la diabetes, en la que la condición de hiperglucemia conlleva al incremento de los radicales libres; en diferentes tipos de cáncer donde el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones aumenta debido a la alta demanda energética; en cardiopatías el exceso de algunos lípidos también aumenta el transporte de electrones en la cadena respiratoria (Ferdinandy *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2009) y en enfermedades neurodegenerativas se relaciona el incremento de especies reactivas con procesos inflamatorios. Cabe recordar que durante estas

enfermedades existe un constante daño a los tejidos y organelos, provocando un decremento de antioxidantes y una producción anormal de radicales libres (Maldonado *et al.*, 2010).

Durante este tipo de enfermedades una de las principales especies reactivas que aumenta es el $\text{NO}\cdot$, que está relacionado con procesos de inflamación por su función como vasodilatador. Los altos niveles de este radical libre son dañinos, ya que tiene una alta afinidad por el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y reacciona mucho más rápido con él que la enzima SOD, enzima encargada de contrarrestar el efecto del $\text{O}_2^{\cdot-}$. Como resultado de la reacción entre estos dos radicales libres se produce una especie altamente reactiva no radical el peroxinitrito (ONOO^-) (Beckman y Koppenol 1996; Kamat, 2006). Esta es una de las especies reactivas no radicales más abundantes en el organismo y tiene la capacidad de reaccionar con los aminoácidos aromáticos de las proteínas, especialmente con la tirosina, a la cual se le agrega el grupo nitro (NO_2) formando 3-nitrotirosina (3-NT). La formación de este compuesto puede causar la inactivación de enzimas dentro de las células (Beckman y Koppenol, 1996; Kamat, 2006; Nishino y Spain, 2006).

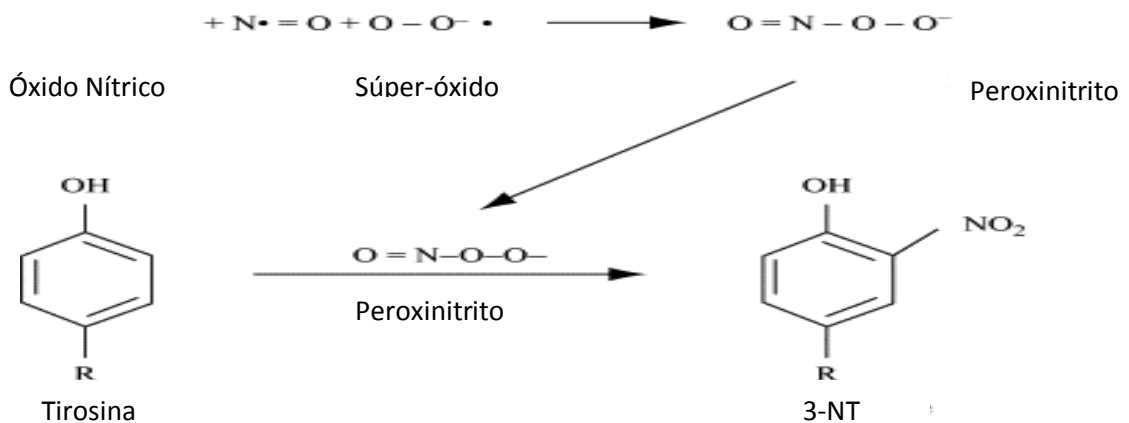


Figura. 2. Formación del compuesto 3-NT. Esquema de la generación de 3 NT, a través de la reacción de óxido nítrico y superóxido (Drew y Leeuwenburgh, 2002).

Hasta ahora no se ha reportado en mamíferos un mecanismo que sea capaz de metabolizar la formación de la 3-NT, siendo ésta una modificación irreversible, por lo que sus niveles aumentan con el paso del tiempo. Drew y Leeuwenburgh (2002) midieron el nivel de 3-NT en hígado de ratas fisiológicamente normales de diferentes edades, demostrando un incremento de este compuesto en ratas de mayor edad. (Figura 3)

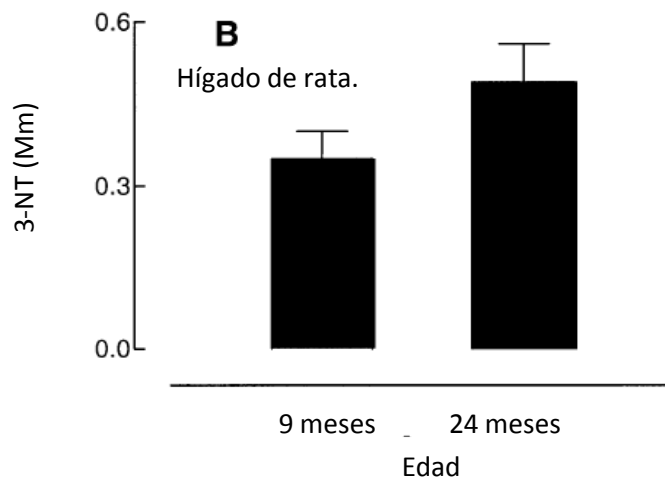


Figura 3. Comparación de niveles 3-NT en ratas de diferentes edades. Comparación de los niveles de 3-NT a partir de su cuantificación en células de hígado de ratas (Drew y Leeuwenburgh, 2002).

Debido a que la formación de 3-NT solo ocurre mediante la reacción con una especie reactiva y a que no se degrada, es decir que su formación es irreversible, su abundancia se utiliza como un biomarcador de daño por estrés oxidante en algunas enfermedades crónico degenerativas (Quian *et al.*, 2013). En la figura 4 se muestra la cuantificación de la 3-NT en células de miocardio en pacientes diabéticos para detectar el progreso de la enfermedad en la cual se observa un incremento en personas diabéticas (Andersson *et al.*, 2009).

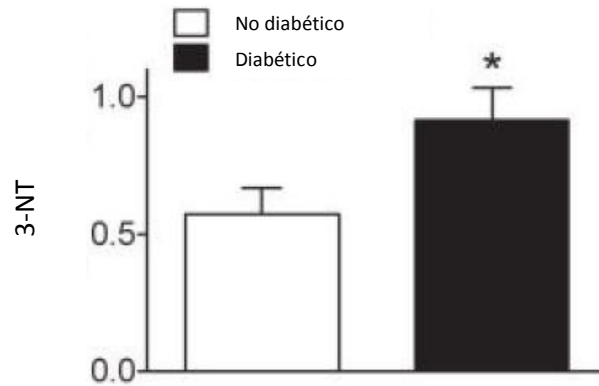


Figura 4. Comparación de los niveles de 3-NT pacientes diabéticos y sanos. Cuantificación de 3-NT para su uso como marcador de daño por estrés oxidante en células de miocardio (Andersson *et al.*, 2009).

Sin embargo, la 3-NT no solo es un biomarcador, ya que la formación de la misma implica un deterioro para la célula. De hecho la formación de la 3-NT se relaciona con la inactivación del grupo funcional de algunas enzimas antioxidantes de la familia de las SOD, asociando con ello el incremento del estrés oxidante (Kamat, 2006).

En enfermedades cardiacas se ha reportado que la 3-NT puede ocasionar fallas en la contracción del miocardio (Ferdinandy *et al.*, 2000) y en enfermedades neurodegenerativas se ha relacionado con la interrupción de la neurotransmisión (Ronson *et al.*, 1999; Dorado *et al.*, 2003). La inactivación de estas biomoléculas se debe a que el grupo nitro que se agrega a la tirosina, impide la fosforilación de la tirosina por ciertas cinasas, impidiendo la transducción señales; por otra parte también puede irrumpir en el ensamble de las subunidades de las proteínas (Kamat, 2006; Halliwell y Gutteridge, 2007)

Considerando el daño que provoca este compuesto y que hasta el momento no se ha reportado ningún mecanismo que revierta este proceso. Nos parece importante buscar una manera para quitar el grupo nitro de la tirosina sin afectar a las proteínas. Recientemente se han reportado algunas enzimas que son capaces

de biodegradar compuestos nitroaromáticos, como la 3-NT, llamadas nitrorreductasas que podrían ayudar a entender mejor este proceso y a tener candidatos para proponer enzimas que un futuro se pudieran tener uso terapéutico.

Nitrorreductasas.

Existen algunos lugares donde debido a la contaminación industrial se forman una gran cantidad de nitrocompuestos, que se caracterizan por tener un grupo nitro en su estructura, tales como, el nitrofenol, el nitrobenceno, el nitrobenzaldehído, etc. Estos compuestos pueden llegar a ser un problema serio de contaminación en el suelo y aire, además de que se han reportado como nocivos para la salud humana. Por estas razones se ha dado gran importancia a aquellos microorganismos que logran sobrevivir en suelos altamente contaminados por este tipo de compuestos, estudiando la respuesta que tienen para adaptarse a estas condiciones, ya que podrían ayudar a la degradación de estos contaminantes (Ju y Parales, 2010; Marques *et al.*, 2010).

En diversos organismos sobre todo procaríotas, se han reportado, enzimas denominadas nitrorreductasas capaces de degradar nitrocompuestos aromáticos. La familia de las nitrorreductasas, en particular las monooxigenasas se caracterizan por tener un grupo flavinadenina-di-nucleótido (FAD), que usando el poder reductor del NADPH y O_2 son capaces de llevar a cabo una reacción de óxido-reducción que permite eliminar el grupo nitro del compuesto aromático. Este proceso se ha descrito que ocurre de la siguiente forma, el primer paso se lleva a cabo en el sitio catalítico de la nitrorreductasa (Flavin-monooxigenasa) el cual utiliza por NADPH, obteniendo NADP y FADH, el FADH a su vez reacciona instantáneamente con O_2 , generando FAD-OOH, este compuesto es capaz de llevar a cabo una reacción de óxido-reducción sobre su blanco (3-NT) sustrayendo de esta forma el grupo nitro (Berkel *et al.*, 2006; Nishino y Spain, 2006; Arora *et al.*, 2010).

Después de que la reacción de óxido reducción se ha llevado a cabo, se obtiene como resultado un grupo nitrito, que en distintos organismos se ha reportado que puede ser utilizado como fuente de nitrógeno. Por otra parte, el compuesto aromático al que se le había agregado el grupo nitro, puede ser utilizado también siendo modificado y llevado al ciclo de Krebs (Ju y Parales 2010).

Recientemente el grupo de Ju y Parales (2010) reportaron 2 cepas de procariontas *Burkholderia* sp. JS165 y *Variovorax paradoxus* JS171, que tienen la capacidad de degradar 3-NT. En estas bacterias se caracterizó una enzima flavin-proteína mono-oxigenasa, capaz de sustraer el grupo nitro de la 3-NT. También mostró que estas bacterias tienen la capacidad incluso para ocupar a la 3-NT como única fuente de nitrógeno reduciendo el grupo nitro hasta su forma de amonio (Nishino y Spain, 2006).

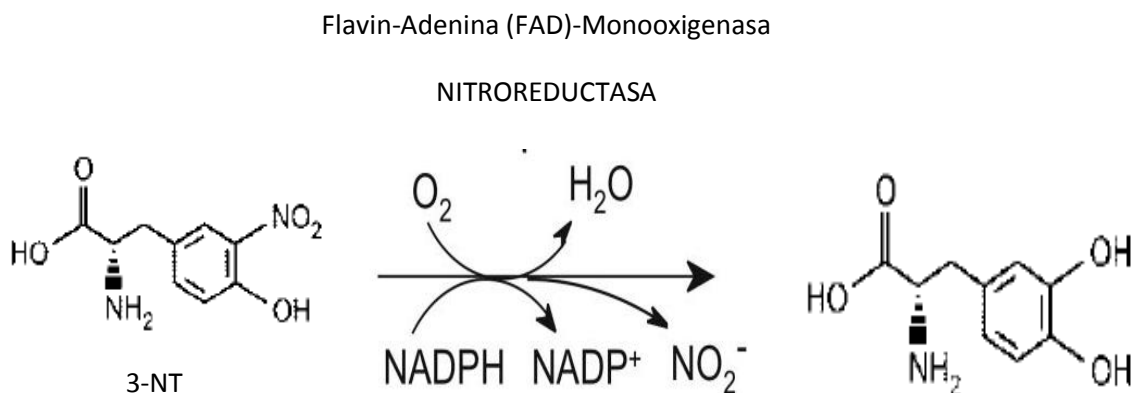


Figura 5. Esquema de la detoxificación de 3-NT por la nitrorreductasa. Esta reacción se lleva a cabo después de una serie de modificaciones en sitio catalítico de la nitrorreductasa (Berkel *et al.*, 2006; Nishino y Spain, 2006; Arora *et al.*, 2010).

A pesar de que en las bacterias *Burkholderia* sp. JS165 y *V. paradoxus* ya se ha descrito el funcionamiento y el tipo de estas nitrorreductasas, su actividad específica para reducir 3-NT a nitritos se considera muy baja, por lo que su uso

como terapia no serían tan efectivos, además de la lejanía filogenética entre una célula procariota y una eucariota, que podría hacer difícil su uso como terapia génica. Por lo que en este trabajo se propone una búsqueda en organismos eucariotas extremófilos.

***Debaryomyces hansenii* (Lodder & Kreger-van Rij, 1984).**

Nuestro grupo de trabajo propone a *D. hansenii* como un modelo biológico de eucariontes para la búsqueda de genes de detoxificación de 3-NT. La levadura *D. hansenii* (Figura 6) ha sido reportada como una levadura de origen marino, que ha colonizado otro tipo de ambientes por ello la podemos encontrarla en diversos lugares, en frutas cristalizadas, queso, carne, vino, cerveza, así como en los productos de alto contenido de azúcar, muchas veces como contaminante de estas (Breuer y Harms, 2006; citado en Montero-Peñalosa, 2012)

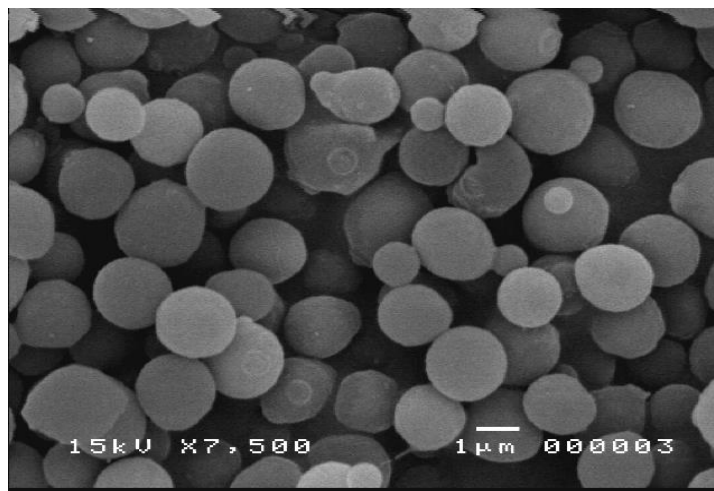


Figura 6. Microfotografía electrónica de células de *D. hansenii*. Tomado de Montero-Peñalosa,2012.

Esta levadura ha llamado la atención debido a su elevada halotolerancia, siendo capaz de soportar concentraciones de hasta NaCl 4M, lo que la hace de gran interés para usos biotecnológicos (Breuer y Harms, 2006; Chao *et al.*, 2009). Es por eso que se han estudiado varios mecanismos de osmorregulación que esta

levadura emplea para sobrevivir ante concentraciones elevadas de NaCl. Entre algunos de los mecanismos que se han caracterizado para la osmoregulación en *D. hansenii*, se encuentra la producción de compuestos llamados orgánicos compatibles, en este caso el almacenamiento de una gran cantidad de glicerol. Por otra parte se han reportado ATPasas que ayudan a la expulsión de iones como K^+ y Na^+ (citado en Montero-Peñalosa, 2012).

Otra característica de *D. hansenii* es que a diferencia de otras levaduras ésta tiene un metabolismo mayormente respiratorio y poco fermentativo, por lo que la mayor cantidad de energía que ocupa proviene de la cadena de transporte de electrones. Esto es de gran importancia debido a que las ATPasas utilizadas para mantener un balance osmótico por esta levadura en altas concentraciones de NaCl comparado con el medio enriquecido YPD. Estos mecanismos requieren un gran gasto energético, teniendo como consecuencia la producción elevada de ERO como se muestra en la figura 7 (Calderón-Torres *et al.*, 2011)

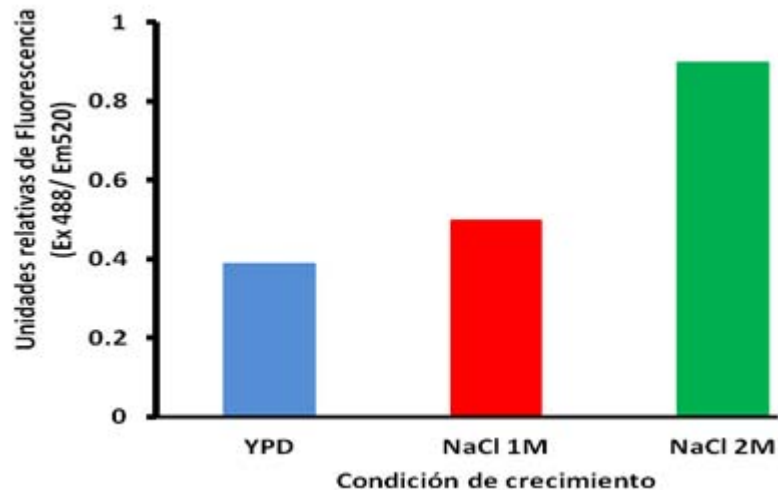


Figura 7. Cuantificación de ERO en extractos celulares de *D. hansenii*. En esta figura se observa un incremento de especies reactivas conforme el aumento de NaCl en el medio donde se cultivó a *D. hansenii* (Montero-Peñalosa, 2012)

Al igual que diversos organismos, *D. hansenii* tiene sistemas antioxidantes que contrarrestan el efecto de las especies reactivas ayudando a mantener un balance de óxido reducción. Recientemente se reportó que durante altas concentraciones de salinidad, hay una sobre expresión del gen *DhARO4*. Este gen codifica para la primer enzima de la síntesis de tirosina; una vez producido este aminoácido es rápidamente oxidado generando grandes cantidades de 3-NT evitando el daño a otras biomoléculas y funcionando como antioxidante (Figura 8) (Calderón-Torres *et al.*, 2011). Sin embargo se ha reportado que la 3-NT libre sigue siendo tóxica (Nishino y Spain, 2006) por lo que se propone que *D. hansenii* debe de tener mecanismos capaces de detoxificarla y así mantener una homeostasis celular.

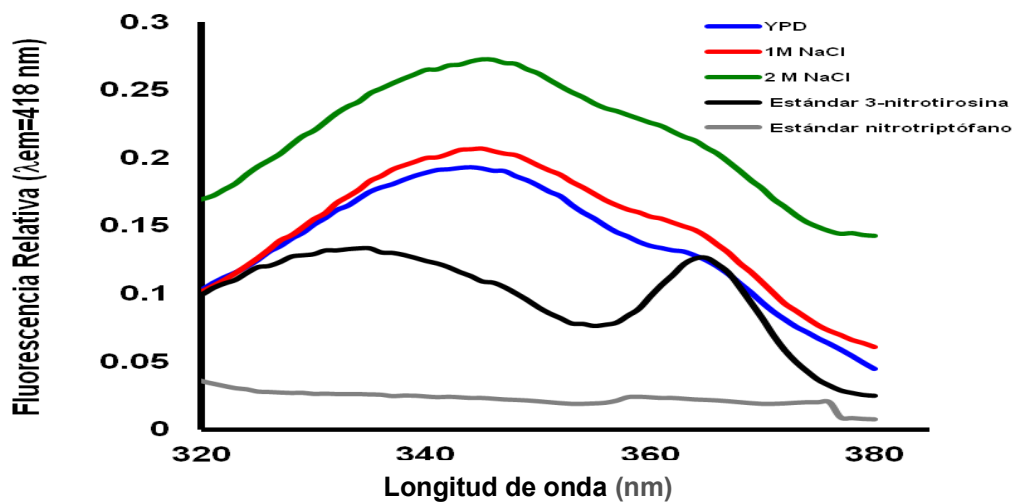


Figura 8. Cuantificación de 3-NT en extractos celulares de *D. hansenii* expuesta a estrés salino. En esta imagen se observa el incremento de la 3-NT en la condición de NaCl 2M (Montero-Peñalosa, 2012).

Los organismos unicelulares como las levaduras, dependen en gran medida de procesos autónomos que le permiten adaptarse eficientemente a los cambios en el medio y en su interior. Uno de los mecanismos usados para la regulación son los factores transcripcionales, que como su nombre lo indica promueven la transcripción de manera específica, coordinando así la expresión genética. Estos

factores pertenecen en su mayoría a una gran variedad de familias de proteínas; entre los más conocidos son los dedos de zinc y los cierres de leucina, llamados así por la composición y la forma de los dominios que interactúan con el DNA (Gasch *et al.*, 2000).

Estos factores cuentan esencialmente con dos dominios funcionales, un sitio que reconoce secuencias específicas en el promotor del gen en el ADN y otro que es activado a su vez por enzimas que pueden estar relacionadas a vías de transducción de señales, que son activadas cuando ha ocurrido alguna alteración de las funciones celulares, que pueden ser cambios ambientales o cambios del medio intracelular, como la falta de nutrientes, cambios en el pH, temperatura, osmolaridad, entre otras. Una vez activados ponen en marcha procesos de transcripción de genes específicos al promover la unión de la RNA-polimerasa, y permitir la transcripción del ADN a ARN, el cual puede ser traducido en proteínas que finalmente generen una respuesta a los distintos cambios, tanto internos como externos (Gasch *et al.*, 2000; Komili y Silver, 2008).

Es por eso que recientemente se realizó una búsqueda *in silico* de los genes que podrían estar involucrados en la detoxificación de la 3-NT que se produce en *D. hansenii*, a través de la relación de factores transcripcionales reportados en diferentes condiciones de estrés (falta de fuentes de nitrógeno, estrés oxidante y salino) en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con las regiones promotoras de todo el genoma de *D. hansenii*, permitiendo tener candidatos de los cuales se evaluó su expresión.

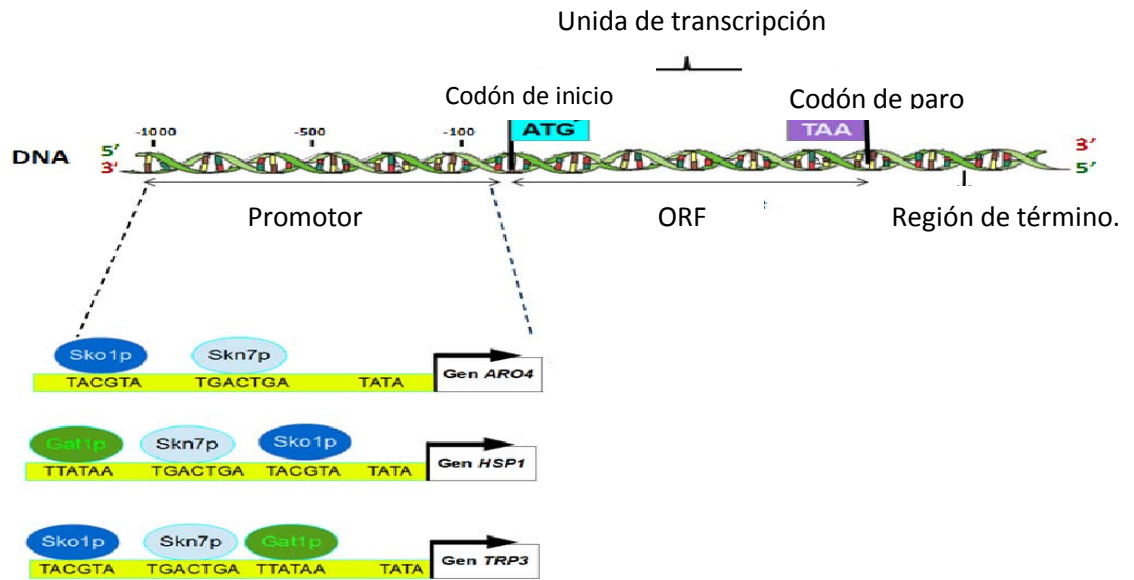


Figura 9. Esquema del funcionamiento de los factores de transcripción. Cada factor transcripcional reconoce secuencias específicas en los promotores de los genes, coordinando la expresión genética (Calderón-Torres sin publicar). En el promotor los factores transcripciones están representados en círculos unidos a la secuencia del ADN que reconocen.

Justificación

Durante algunas enfermedades crónicas degenerativas se ha detectado el aumento de la formación de 3-NT, que está relacionada con la progresión y el agravamiento de la enfermedad. No se han reportado mecanismos en el humano para revertir esta situación, por lo que existe un aumento en los niveles de 3-NT. Por estas razones en este trabajo se busca una enzima capaz de metabolizar este compuesto, basando la búsqueda en un modelo eucariota como *D. hansenii* y posteriormente proponerlo como una terapia génica.

Hipótesis

Durante un estado de estrés oxidante en *D. hansenii* se expresa el gen *DhAro4* el cual está involucrado en la síntesis de tirosina. Esta respuesta ha sido calificada como antioxidante, debido a que la tirosina es rápidamente oxidada formando 3-NT, evitando el daño a biomoléculas. Puesto que en este esquema la 3-NT es formada en altas concentraciones, es muy probable que *D. hansenii* tenga genes que codifiquen para enzimas que ayuden a detoxificar este compuesto.

OBJETIVOS

Objetivo General

Seleccionar y evaluar la expresión de los genes de degradación de 3-NT a partir de los resultados de la búsqueda *in silico* de las secuencias de unión a los factores transcripcionales que regulan la respuesta a estrés salino, oxidante y por cambio de la fuente de nitrógeno en la levadura *D. hansenii*.

Objetivos particulares.

- Determinar si *D. hansenii* puede ocupar el compuesto 3-NT. mediante la obtención de curvas de crecimiento con un medio que contenga como única fuente de nitrógeno a 3-NT.
- Seleccionar genes a partir de la búsqueda *in silico* en todo el genoma de *D. hansenii*.
- Evaluar de la transcripción del ARN mensajero de los genes candidatos en las diferentes condiciones de estrés establecidas mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa.

METODOLOGÍA

Curvas de crecimiento

La levadura *D. hansenii* cepa CBS767 se mantuvo en medio sólido enriquecido YPD (extracto de levadura 1%, peptona 1% y glucosa 2%; agar 2%) a 4°C. Para los ensayos de crecimiento se hicieron precultivos, es decir que las células se cultivaron anteriormente en medio líquido YPD sin sodio por 24 h a 28°C, en agitación constante. A partir del precultivo, se tomaron alícuotas para que los medios de prueba tuvieran una Densidad Óptica (DO) de arranque de 0.4 a 600nm de longitud de onda. Los medios de prueba fueron incubados en espectrofotómetro de lectura automática Bioscreen que se encuentra en el laboratorio 306 Oriente del Instituto de Fisiología Celular-UNAM. Este aparato consiste de una incubadora acoplada a un espectrofotómetro y una computadora para la selección de las condiciones de crecimiento (temperatura, agitación, intervalo de lectura, período del registro y longitud de onda de lectura). Los medios de prueba fueron Medios Mínimos (MM), con las fuentes de nitrógeno modificadas. En el primer medio, la fuente de nitrógeno se sustituyó por 3-NT 10mM y el segundo se dejó sin ninguna fuente de nitrógeno como control negativo. Una vez inoculados incubaron por una semana, en un espectrofotómetro de lectura continua a 28°C con una agitación constante que media la D.O. cada hora. Los datos de iniciales y finales se analizaron y se compararon entre los dos medios, con la prueba estadística T de Student, con ayuda del programa Prism 5.

Selección de genes

Para elegir los genes a evaluar en este trabajo, se revisó el análisis *in silico* de la relación entre factores transcripcionales regiones promotoras del genoma de *D. hansenii*. Como criterios de inclusión se tomaron dos aspectos; el primero fue que poseyeran función de flavin-adenin-monooxigenasa u oxido reductasa y el

segundo fue que tuvieran relación con más de un factor transcripcional. Posteriormente para conocer la secuencia de ADN de los genes seleccionados, se consultó la base de datos GENOLEVURES (www.genolevures.org). A partir de estas secuencias se diseñaron oligonucleótidos de anclaje para cada gen con el programa Primer 3 (v. 0.4.0) disponible en internet (<http://primer3.ut.ee/>).

Extracción de ADN genómico.

A partir de un cultivo líquido de *D. hansenii* en YPD, se obtuvo un precipitado o paquete celular, con un palillo se tomó un el paquete celular lo suficientemente numeroso directamente de la placa y se resuspendió en 50µl de agua estéril previamente colocados en un tubo eppendorf. Después se adiciono 0.2ml de amortiguador de lisis [Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM Tris-Cl 10 mM pH 8.0 y EDTA-Na2 1mM] y 0.2 ml de la mezcla Fenol: Cloroformo: Isoamílico (25: 24: 1) así como 0.3g de perlas de vidrio previamente tratadas con HCl. El tubo se agito 4 min por vortex. Una vez terminado la fase de agitación al tubo se le agregó 0.2 ml de TE pH 8.0 y se centrifugo por 5 minutos a 13,000 rpm en una microcentrifuga refrigerada. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo al cual se le añadió 1 ml de etanol al 100% y se mezcló por inversión, Se centrifugo 2 min a 13,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 0.4 ml de TE y 4 µl de solución de ARNasa [20 mg/ml], esta mezcla se incubo a 37°C por 30 min. Posteriormente se agregaron 10 µl de acetato de amonio y 1ml de etanol al 100% y se mezcló por inversión, luego se centrifugo por 2 min a 13,000 rpm. El precipitado se resuspendió en agua estéril y se mantuvo a -20°C.

Extracción de ARN

A partir de un precultivo de *D. hansenii* en medio líquido YPD, se tomaron alícuotas para inocular medios de prueba para que tuvieran una DO inicial de 0.4 a 600nm. Antes de pasar la alícuota del precultivo a los medios de prueba las

células, se lavaron dos veces con agua estéril para tratar de quitar por completo el medio YPD residual. Los medios de prueba fueron para el control solamente YPD y los tratamientos de estrés salino: YPD + NaCl 1M y YPD + NaCl 2M; como tratamiento por cambio en la fuente de nitrógeno se utilizó Medio Mínimo sin sulfato de amonio y se le añadió 3-nitrotirosina 10 mM. Los cultivos se dejaron incubar el tiempo suficiente para que llegaran a una DO de 0.9 a 1.2. Una vez verificada la DO se realizó la extracción de ARN mediante la técnica de biología molecular del fenol caliente modificada de Schmitt (Calderón, 2006). El ARN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm. Y posteriormente se evaluó la integridad y calidad del ARN mediante electroforesis en geles de agarosa (1%) desnaturalizantes en presencia de formaldehído.

RT-PCR semicuantitativo y análisis densitométrico.

Una vez cuantificado el ARN, se dio un tratamiento con ADNasa (Invitrogen) siguiendo el protocolo comercial. Para obtener la primera copia del ADN complementario (ADNc) del ARN mensajero de interés, se hizo una reacción de transcripción inversa con la enzima Súper Script III (Invitrogen) siguiendo el protocolo comercial. Posteriormente mediante PCR convencional se obtuvo la segunda copia del ADNc y su amplificación masiva para visualizar y analizar por densitometría los cambios en la expresión de los genes seleccionados. En los primeros ensayos se hizo una PCR semi-cuantitativa para la estandarización de los ciclos, obteniendo muestras a 20, 30 y 40 ciclos. La condición de cada ciclo se muestra en la tabla I. Los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% usando marcadores del tamaño de ADN de 1 Kilobase (Invitrogen). Para la evaluación de la síntesis de ARN se utilizó el programa de densitometría Image Lab (BioRad). Los datos de cada gen se normalizaron contra el gen de actina de *D. hansenii*. Una vez obtenido los 3 resultados independientes se promediaron y posteriormente se analizaron utilizando el programa Prism 5, con prueba de ANOVA.

Para asegurar que no hubiera contaminación de ADN genómico, se tomó como control ARN al cual se trataba de la misma forma que las muestras, pero a este no se le agrego la enzima Súper Script III (Retro-transcriptasa); por lo tanto se impedía la obtención de ADNc. Estos resultados no se presentaron en el trabajo.

Tabla I. Condiciones de temperatura y tiempo de Retro transcripción.

Temperatura (C°)	Tiempo	Paso
25	5 min	Hibridación
50	60 min	Retro- transcripción
70	15 min	Inactivación de la retro-transcriptasa.

Tabla II. Condiciones de temperatura y tiempo de PCR.

Temperatura (C°)	Tiempo	Paso
94	2 min	Desnaturalización.
94	15 s	Desnaturalización.
Temperatura de primer.	30 s	Hibridación.
72	1 min	Elongación.

Tabla III. Nombre de los genes a evaluar con la técnica molecular de RT-PCR y su temperatura de hibridación estimada para obtener un producto con PCR.

Gen	Temperatura (°C)	Tamaño (PB)
DEHAG08162g	52	302
DEHA2D17446g	52	480
DEHAC03036g	53	334
DEHAE24178g	53	443
DEHAC14784g	54	690
DEHAC00286g	53	480

Actina	54	820
---------------	-----------	------------

Tabla IV. Secuencias de los oligonucleótidos de anclaje para cada gen seleccionado con la búsqueda *in silico*.

Gen	Secuencia, Forward (5' a 3')	Secuencia, Reverse (5' a 3')
DEHA2G08162g	GTTGCTAAACCCGAATCTTCTG	TATTAGAATTATCCCAATCCTCCTTCT CAC
DEHA2D17446g	ACAGCCACCTGGAACAAC	CGGAACGCATGTCTAGTG
DEHA2C03036g	AGCAAGCAATTCTCGTACGC	AGCTTGTGGGGTGATTCTGA
DEHA2E24178g	TGATAAAGCGGTTGAGTCGG	TGCCTTTCACCGCATCATG
DEHA2C14784g	TGCCTCCGGTACTTCTGT	GCAAACAAGGGCTTGACAAA
DEHA2C00286g	AGCGACGGGTTATTATCCTT	TGCTTCTTCATCATAGATAGCG

Resultados y discusión

Curvas de crecimiento con 3-NT

La levadura *D. hansenii* al igual que otros microorganismos halotolerantes, tiene mecanismos de osmoregulación para modular tanto la presión osmótica como los efectos o daños del metabolismo celular, que se producen durante el estrés salino, entre algunos mecanismos ya descritos, se encuentran bombas que permiten la expulsión de diferentes iones usando ATP, o el almacenamiento de glicerol, permitiendo una estabilidad osmótica y el crecimiento de la levadura en medios con una concentración de hasta NaCl 4M (citado en Montero-Peñalosa, 2012). Sin embargo, durante su desarrollo en este tipo de condiciones se genera un estado de estrés oxidante.

Esto es debido a que el estrés salino aumenta la respiración celular en respuesta a la alta demanda energética de los mecanismos que ayudan a contrarrestar los efectos del NaCl (citado en Montero-Peñalosa, 2012). Dado que se presenta un estado de estrés oxidante se han estudiado algunos sistemas que ayudan a mantener la homeostasis celular, entre ellos se ha reportado que durante este estrés combinado, como el salino que a su vez conduce al estrés oxidante, se sobreexpresa el gen *DhARO4*, que está involucrado en la síntesis de tirosina, la cual es utilizada como blanco para las especies reactivas, siendo rápidamente modificada a 3-NT y así evitando la modificación de proteínas importantes para el organismo (Calderón-Torres *et al*, 2011).

Durante el trabajo de Montero-Peñalosa en 2012 se observó que al agregar tirosina libre a un medio YPD con NaCl 2M el crecimiento de *D. hansenii* aumentaba ligeramente con respecto al control sin tirosina. Esto sugiere que *D. hansenii* es capaz de crecer mejor debido a que la tirosina puede estar funcionando como un antioxidante, lo cual genera la producción de 3-NT observada en dicho trabajo, posteriormente se propuso que al ocurrir la formación de 3-NT, *D. hansenii*

es capaz de degradar este compuesto y usarlo para su durante su crecimiento, a pesar de que se ha descrito como una levadura que obtiene nitrógeno mayormente a partir de proteólisis (Vigliotta *et al*, 2006).

Tenemos antecedentes de organismos capaces de usar nitrocompuestos como fuentes de nitrógeno a través de enzimas denominadas nitrorreductasas que tienen la capacidad de eliminar el grupo nitro de los aminoácidos aromáticos a través de reacciones de óxido reducción (Marques, *et al*, 2010; Kou-San y Parales, 2010). Incluso se han reportado enzimas de la familia flavin-monooxigenasas en las bacterias *Burkholderia sp.* JS165 y *V. paradoxus* JS171, las cuales son capaces de biodegradar la 3-NT, quitando el grupo nitro y reduciéndolo a nitrito para después usarlo como fuente de nitrógeno durante su desarrollo, ocupándolo como única fuente de nitrógeno (Nishino y Spain, 2006).

Con base a la información anterior se estableció la hipótesis de que *D. hansenii* tiene enzimas capaces de degradar la 3-NT y posteriormente metabolizarlo. Para comprobar esta hipótesis se realizaron curvas de crecimiento con MM, al cual se le cambió la fuente de nitrógeno, de sulfato de amonio por 3-NT 10mM dejándola como única fuente de nitrógeno en el medio; por otra parte, como control negativo se utilizó MM sin ninguna fuente de nitrógeno (MM -3-NT). Figura 10.

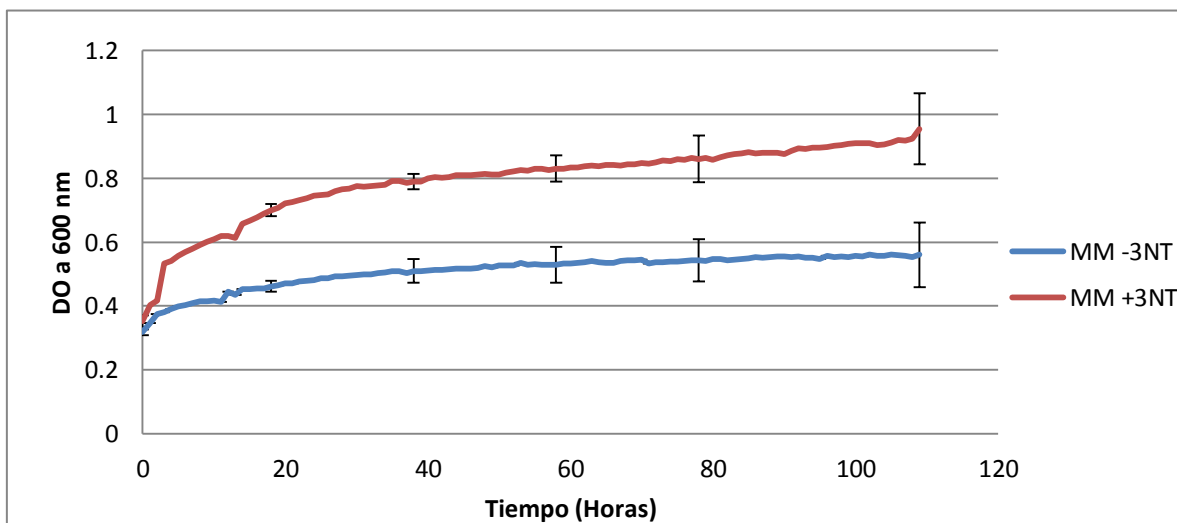


Figura 10. Crecimiento de *D. hansenii* en MM+3NT y MM -3NT El crecimiento de *D. hansenii* se realizó en medio líquido y se registró en un espectrofotómetro automático a una λ 600 nm por 140 h. Los datos son el resultado del promedio de tres experimentos independientes. Las barras representan la desviación de estándar.

Con la prueba estadística de T de Student se corroboró la paridad entre los datos de la DO de inicio, los cuales no mostraron diferencia significativa ($P < 0.05$).

En la figura 10 observamos que en el medio que carecía de fuente de nitrógeno se registró un leve crecimiento que pudo deberse a que la levadura tuviera en el citoplasma un remanente de nutrientes del precultivo YPD, aunado a la capacidad ya reportada de esta levadura para el almacenamiento de nutrientes (citado en Montero-Peñalosa, 2012). Cabe resaltar que el medio con 3-NT alcanzó una D.O de 1.2, siendo significativamente mayor ($P < 0.05$) que el control negativo por lo que al ser la 3-NT la única diferencia entre estos 2 medios podemos deducir que *D. hansenii* es capaz de usar este compuesto como única fuente de nitrógeno.

Debido a los resultados anteriores observados en la curva de crecimiento una de nuestras hipótesis, es que *D. hansenii* debe tener los mecanismos para quitar el grupo NO_2 de la tirosina y por ello puede crecer en presencia de 3-NT, aunado a lo anterior es probable que en la degradación y asimilación de 3-NT *D. hansenii* tenga las mismas vías de funcionamiento de las enzimas que se han caracterizado en los distintos organismos que degradan nitro-compuestos (Marques *et al.*, 2010; Nishino y Spain, 2006). Esto es que una vez que el grupo nitro es separado por acción de la nitroreductasa de la tirosina, es reducido a nitrito, por otra enzima. Se ha reportado que el nitrito que puede ser usado por *D. hansenii* en condiciones de escases de nitrógeno (Vigliotta *et al.*, 2006). Es decir que puede tener dos tipos de enzimas, las que quitan el grupo nitro y las que permiten la asimilación de nitritos.

Una vez confirmado el uso de la 3-NT se seleccionaron los genes candidato a partir de la búsqueda *in silico*, de la siguiente manera.

Selección de genes y RT-PCR.

En la búsqueda *in silico* que se tiene como antecedente para este trabajo, se utilizaron los factores de transcripción reportados para la levadura *S. cerevisiae* durante diferentes condiciones estresantes, como, el aumento de la salinidad, el estrés oxidante y por falta o cambio de una fuente de nitrógeno. Su empleo para la búsqueda de genes de respuesta a 3-NT en *D. hansenii*, permitió encontrar los diferentes genes que se usaron en este trabajo, los factores utilizados y la secuencia que reconocen en el ADN, se muestran en la Tabla V.

Tabla V. Factores de transcripción usados para el análisis *in silico*. Las secuencias de estos factores fueron comparadas con la región promotora de cada gen de *D. hansenii*.

Factor de Transcripción.	Tipo de estrés al que responden	Expresión completa de los sitios de unión de los FT	Secuencia abreviada de los sitios de unión a FT*
Sko1p	Salino	TGACGT[AC]	TGACGTM
Msn2p/Msn4p	Salino	AGGGG	AGGGG
Yap1p	Oxidante	TTA[CGT]TAA	TTABTAA
Skn7p	Oxidante	GGC[CT]GGC	GGCYGGC
Gcn4p	Falta de aminoácidos	TGA[GC]TCA	TGASTCA
Gat1p	Cambio de fuente de nitrógeno	[AT]GAT[AT][AG][ACT]	WGATWRH
Gln3p	Cambio de fuente de nitrógeno	GATAAG	GATAAG

A partir de los resultados de la búsqueda *in silico* se obtuvo una lista de 150 genes candidatos para la detoxificación de 3-NT en *D. hansenii*. Este conjunto comprendía genes implicados en el transporte de aminoácidos, transporte

dependiente de ATP, sistemas de proteólisis, endopeptidasas y oxido reductasas. Entre estos se seleccionaron los genes a partir de los criterios anteriormente descritos, encontrando genes que codifican para enzimas oxido-reductasas en particular las monooxigenasas de flavin y nicotidin adenina, pues están definidas con función de nitrorreductasa ya que eliminan el grupo NO₂ de la tirosina. Tabla VI.

Tabla VI. Genes obtenidos a partir de la búsqueda *in silico*. La función de cada gen así como su tamaño fue obtenido de la base de datos GenoLevures.

Nombre	Función	FT	Tamaño (PB)
DEHAG08162g	Oxido-reductasa	Yap1/Msn2-Mns4/Gln3/Gat1	302
DEHAD17446g	Oxido-reductasa	Yap1/Msn2-Msn4/Gln3	480
DEHAC03036g	Oxido-reductasa	Yap1/Gln3/Gat1	334
DEHAE24178g	Flavin-mono-oxigenasa	Yap1/Gln3/Gat1	443
DEHAC14784g	Oxido-reductasa	Yap1/Gat1	690
DEHAC00286g	Flavin-mono-oxigenasa	Yap1/Gln3	480

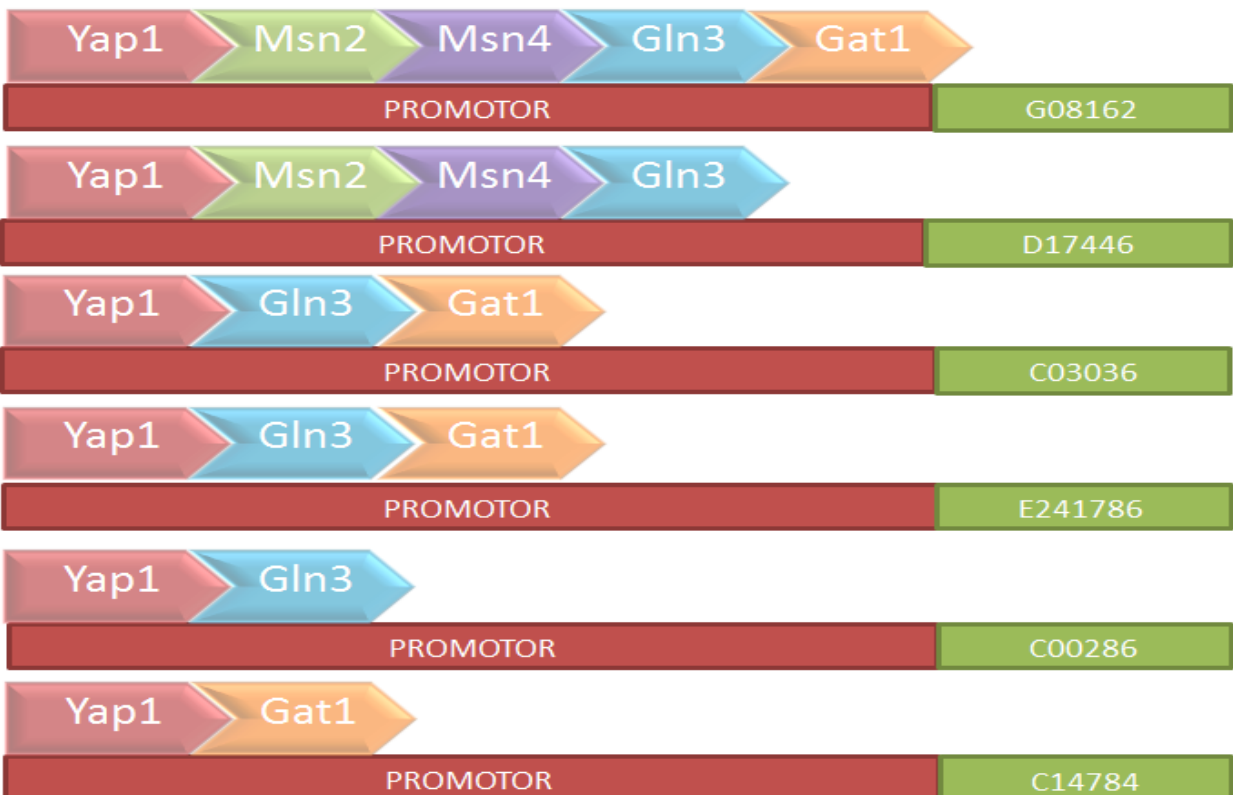


Figura 11. Esquema de la unión de los factores transcripcionales con la región promotora de cada uno de los genes seleccionados.

Basados en este esquema se observan factores transcripcionales con diferentes motivos, es decir, factores capaces de regular a más de un gen, parte fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular (Komili y Silver, 2008). Esta relación entre factores de transcripción y la región promotora, se debe a la complementariedad entre las secuencia de ácidos nucleicos que permite un reconocimiento específico de cada uno de estos. Sin embargo existen secuencias de reconocimiento que no son totalmente específicas, es decir que pueden variar en algunos sitios, como ejemplo tenemos a Gat1 cuya secuencia se describe como (WGATWRH) esta secuencia puede detectar en la posición W= una adenina o una timina, permitiendo una mayor variedad de blancos. Muchas veces estas secuencias son conservadas como el caso de Gat1 y Gln3, si bien no son exactamente idénticas, estos factores se han clasificado dentro de la familia GATA, debido a que las secuencias que reconocen tienden a poseer una cierta secuencia parecida a este tipo de bases nitrogenadas (GATA) (Kuge *et al.*, 1997; Rep *et al.*, 2000).

Es importante mencionar que todos estos factores (Yap1, Msn2/4, Gat1 y Gln3) se localizan en el citoplasma, y cada uno posee modo de activación específico; por ejemplo Msn2 y 4 son fosforilados por diversas enzimas dependiendo del tipo de estrés, Yap1 es oxidado por H₂O₂, mientras que Gat1 y Gln3, son secuestrados por Ure2 en el citoplasma; Ure2 es responsable de la detección de fuentes asimilables de nitrógeno que al reducir su concentración permite su liberación; una vez activados todos estos factores son traslocados al núcleo permitiendo la activación de los diversos genes sobre los que actúan (Kuge *et al.*, 1997; Rep *et al.*, 2000; Georis *et al.*, 2009).

Una vez que los genes fueron seleccionados, se obtuvieron sus secuencias *in silico* de la página en línea GenoLevures (<http://genolevures.org/yeastgenomes.html>) y se diseñaron los oligonucleótidos de anclaje con el programa Primer3. Para estandarizar las temperaturas de hibridación así como prueba de nuestro oligonucleótidos, se realizó un PCR con ADN genómico, que se muestra en la figura 12, en ella se observa que efectivamente el tamaño de las bandas de ADN, corresponden al tamaño de los fragmentos seleccionados para amplificar por PCR.

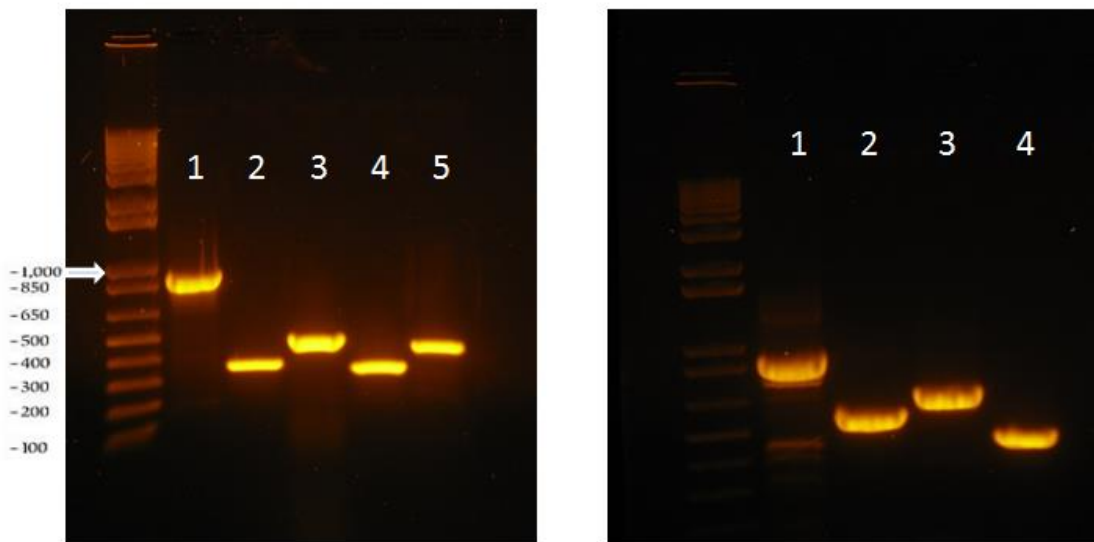


Figura 12. PCR de ADN genómico de los genes seleccionados. En esta imagen se observa las bandas correspondientes a los fragmentos de los genes seleccionados como forma de comprobar la función de nuestros oligonucleótidos. Orden, A) 1.-Actina (820pb), 2.-DEHA2G0816g (302pb), 3.- DEHA2D17446g (480pb), 4.- DEHA2C03036g (334pb), 5.- DEHA2E24178g (443pb). B) 1.-Actina (820pb), 2.- DEHA2F17006g (590pb), 3.- DEHA2C14784g (690pb), 4.- DEHA2C00286g (480pb). El Marcador de tamaño del ADN utilizado fue el 1 KB plus de Invitrogen.

Al haber descartado fragmentos inespecíficos, como los que se observan en la Figura 1B, establecimos las condiciones óptimas para la amplificación de cada uno de nuestros genes, permitiendo así realizar los experimento de RT-PCR semicuantitativo.

Evaluación de la expresión genética utilizando transcripción inversa acoplada a una amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Para someter a *D. hansenii* a los tipos de estrés salino, oxidante y falta de nitrógeno, la levadura fue cultivada en diferentes medios, que representan estos tipos de estrés, en los que se esperaba una respuesta a nivel de la síntesis de ARN mensajero de acuerdo a los distintos factores transcripcionales que se usaron; para el estrés salino que tiene como consecuencia el estrés oxidante se usó un MM+NaCl 2M, debido a que en las condiciones con altas concentraciones de NaCl es donde fue observado un aumento en la generación de especies reactivas, y la formación de la 3-NT a partir de la expresión del gen *DhARO4* (Calderón-Torres *et al*, 2011). Para el estrés de escasas de nitrógeno se usó MM en el cual se sustituyó la fuente de nitrógeno por 3-NT obligando a usar los genes para la detoxificación de este compuesto. Además MM normal como control positivo.

Para la estandarización de los ciclos, los primeros RT-PCR que se realizaron fueron de tipo semicuantitativo, tomando muestras a los 20, 30 y 40 ciclos. Como se observa en las figura 13, se puede visualizar las bandas adecuadamente a 30 ciclos. Por lo que se estableció como base para los siguientes PCR.

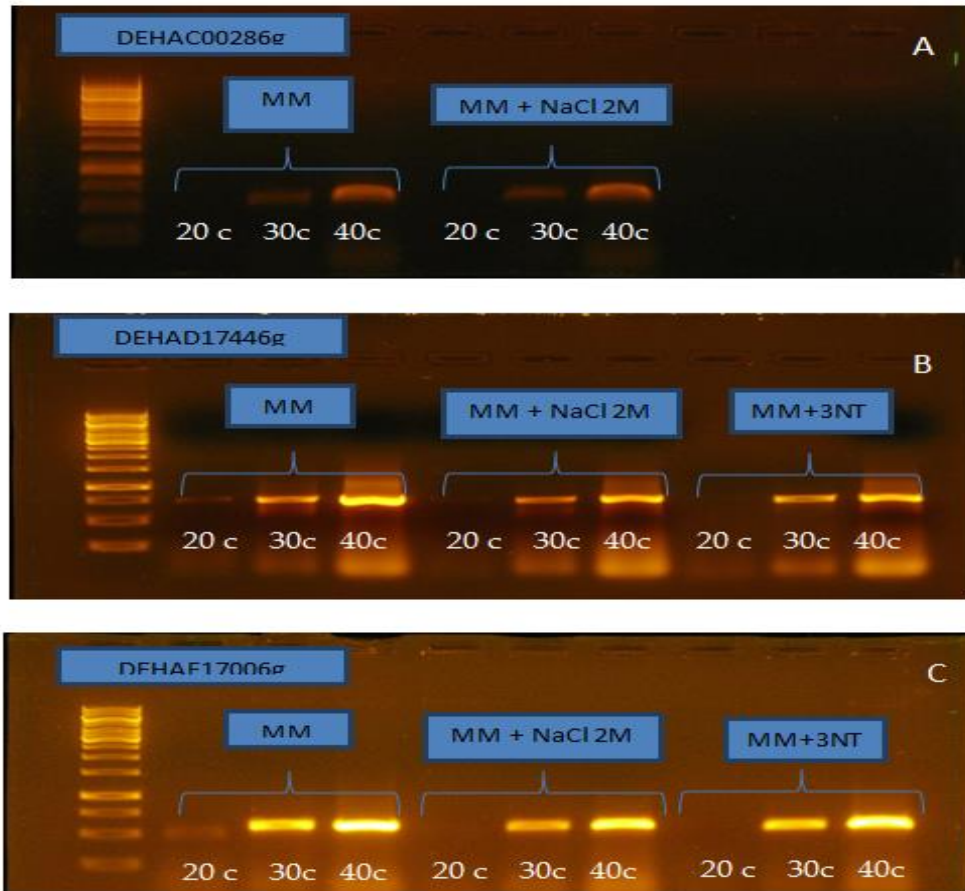


Figura 13. Resultados de la estandarización de RT-PCR de los genes seleccionados. En la imagen se puede visualizar las bandas de ADNc amplificado a los 20, 30 y 40 ciclos, como forma de estandarización de la PCR complementaria a la RT. Imagen A) gen DEHA2C00286g, B) gen DEHA2D17446g, C) gen DEHA2F17006g.

Además de la estandarización para los ciclos de la PCR, estos fueron los primeros resultados tomados para analizar los niveles de expresión entre los diferentes medios tomando como control al MM. Sin embargo, en estos primeros ensayos no se apreció un cambio en los niveles de síntesis de ARNm en los medios de tratamiento con respecto al control. Por lo que se estableció la posibilidad de que el MM, fuera un causante de estrés debido a que obliga al organismo a sintetizar sus propios ácidos nucleicos y aminoácidos lo cual requiere de una alta demanda de energía, recordando que esta levadura obtiene

mayormente los aminoácidos por proteólisis (Vigliotta *et al.*, 2006; citado en Montero-Peñalosa, 2012). Por esta razón se decidió agregar como control positivo un medio enriquecido como el de YPD, brindando todas las facilidades de crecimiento a la levadura. Una vez cambiando nuestro medio control se observó una diferencia de los niveles de expresión entre los tratamientos con respecto al control, como se muestra en la figura 14. Aunado a lo anterior al hacer los ensayos preliminares de RT-PCR se encontró que los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen de Actina de *D. hansenii* generaban un tamaño diferente al esperado; por lo que se enviaron a sintetizar oligonucleótidos diferentes para la amplificación del gen de Actina, estos generaron un producto de 200 pb tanto en el PCR de ADN genómico como en el RT-PCR preliminar.

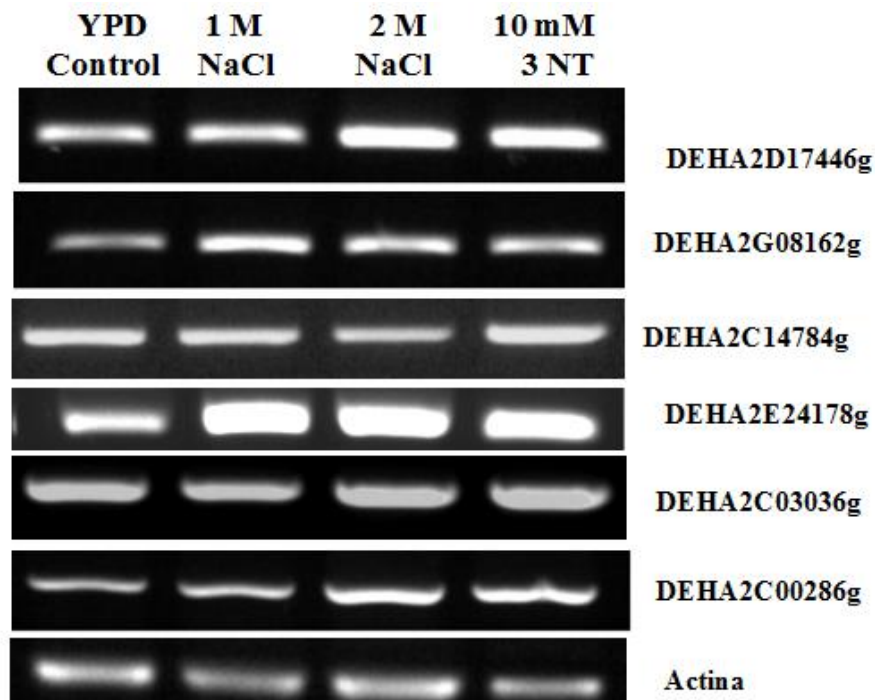


Figura 14. Expresión de los genes seleccionados mediante RT-PCR. Condiciones de estrés salino (NaCl 1M y NaCl 2M) y por cambio en la fuente de nitrógeno (3-NT 10 mM)

A partir de estos resultados se evaluó la expresión genética con el programa de densitometría Image Lab (BioRad), para el cual se utilizaron 3 repeticiones independientes de cada RT-PCR. Como control se utilizó al gen de actina para conocer la transcripción basal en *D. hansenii* y a partir de esta poder compararla con los genes seleccionados en este trabajo y discernir si realmente hay aumento o no, como se muestra en la Figura 15.

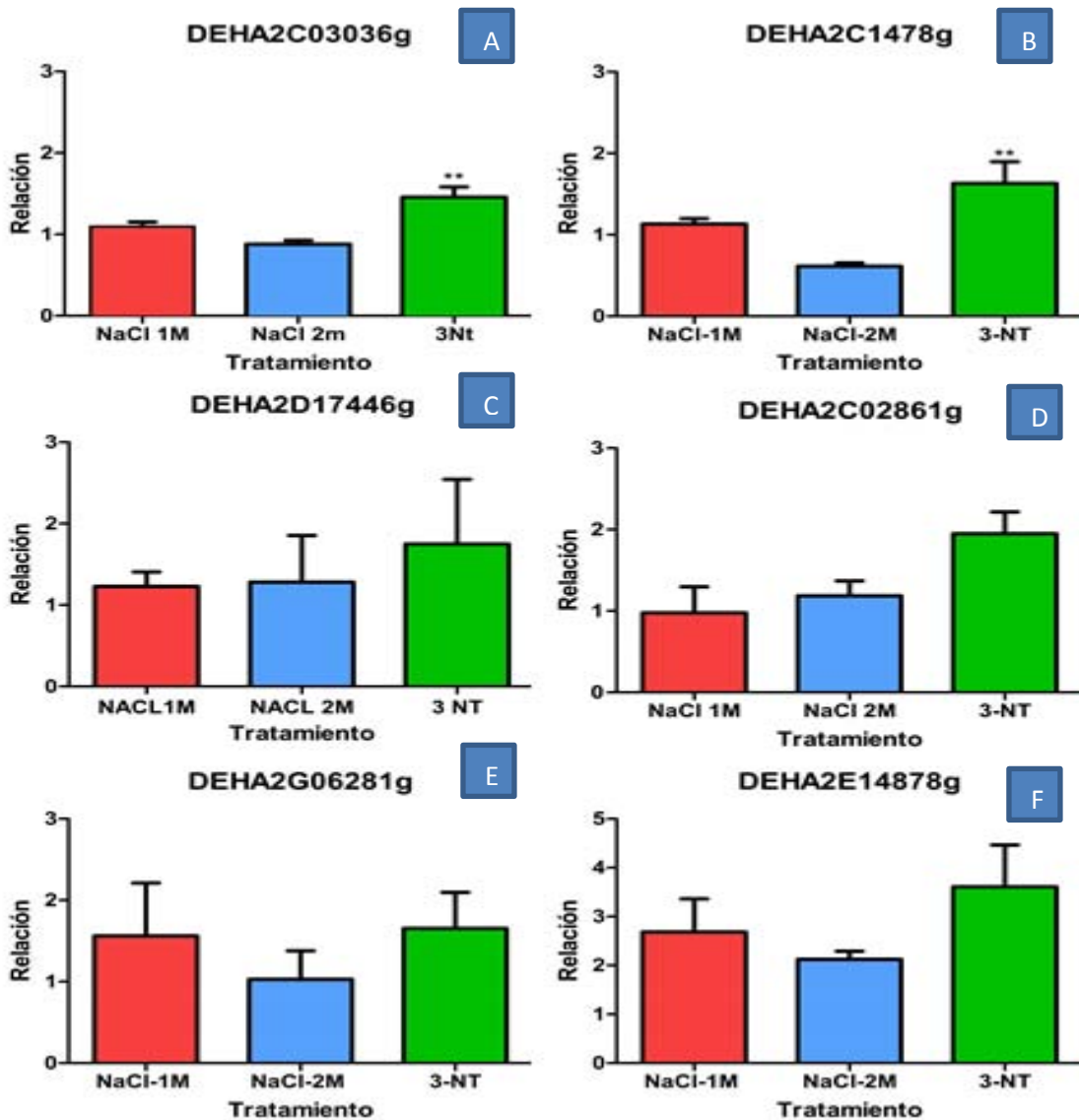


Figura. 15. Comparación de la expresión de los genes de prueba con respecto al gen de actina. Los valores de proporción o relación de cambio son el

resultado de la expresión en cada tratamiento con respecto al control YPD. La expresión de cada gen se presenta como el promedio de 3 experimentos independientes. Diferencia significativa (**) ($P < 0.05$). Los genes A) DEHA2C03036g y B) DEHA21478g mostraron un aumento significativo en el medio con 3-NT como fuente alterna de nitrógeno.

En general con respecto a la figura 15, aunque la expresión de los genes DEHA2G08162g, DEHA2D17446g, DEHA2E24178g y DEHA2C00286g tiene una clara tendencia al aumento en los medios con 3-NT y para los genes DEHA2E24178g y DEHA2G06282g hay un aumento en la condición de NaCl 1M, en ambos caso no confirmamos que los cambios fueran significativos. Esto se puede explicar debido a que *D. hansenii* ha sido descrita como una levadura preferentemente respiratoria y poco fermentativa, es decir que obtiene energía principalmente de la cadena transportadora de electrones, por lo que la producción de especies reactivas en esta levadura es un proceso continuo durante su crecimiento y por ello la expresión de los genes encontrados debe ser continua y no de grandes cambios. Lo anterior se mostró en el trabajo de Montero-Peñalosa en 2012, en donde se midieron las especies reactivas en diferentes medios, reportando la generación de éstas incluso en un medio de YPD, por lo que es de suponerse que estos genes DEHA2G08162g, DEHA2D17446g, DEHA2E24178g y DEHA2C00286g sean fundamentales para mantener la homeostasis en la célula.

Para poder explicar mejor la expresión genética observada en este trabajo es importante señalar la relación de las secuencia de unión de los factores transcripcionales utilizados en la búsqueda de nuestros genes candidatos, ya que de estos depende el comportamiento de su expresión en los diferentes medios.

Como habíamos mencionado, uno de los criterios para elegir los genes era que tuvieran relación con al menos 2 factores transcripcionales, ya que es muy probable que esta relación del promotor de los genes seleccionados con más de 1

factor permita al organismo responder de forma óptima a condiciones específicas como el estrés oxidante que se genera a partir del estrés salino, permitiendo expresar los genes necesarios para mantener la homeostasis celular (Gash, *et al.*, 2000; Komili y Silver, 2008).

Es importante primero mencionar nuestro medio control YPD en el cual No debería de inducir ningún tipo de estrés, sin embargo, existe un nivel de expresión que bien puede ser basal, es decir que los genes estén relacionados al equilibrio de óxido-reducción celular y que su expresión se requiera aun en medios sin estrés; esto puede explicarse debido a la acción del factor transcripcional Yap1 relacionado la generación de especies reactivas (Kuge *et al.*, 1997), las cuales tienen un incremento incluso en este medio como se demuestra en el trabajo de Montero-Peñalosa en 2012.

Cabe destacar que el factor Yap1 está relacionado con todos los genes seleccionados en este trabajo, como se muestra en la figura 11. Este factor es de suma importancia al ser el principal responsable de activar la transcripción de genes de respuesta durante condiciones de estrés oxidante en la levadura *S. cerevisiae* (Gash *et al.*, 2000) Yap1 responde al ser estimulado por el H₂O₂ derivado de las especies reactivas de oxígeno (Kuge *et al.*, 1997); esto es consistente con el incremento de especies reactivas en todos los medios, incluso en el medio YPD, como se había señalado anteriormente, lo que podría estar llevando a una expresión basal de todos los genes evaluados.

No obstante dado que nosotros agregamos NaCl 1M y NaCl 2M como una forma de generar simultáneamente estrés salino y oxidante, sin olvidar la formación de 3-NT durante estas condiciones, no podemos atribuir a un solo factor la expresión de nuestros genes. En los medios con NaCl 1M y 2M pensamos que los principales factores involucrados no solo son Msn2/Msn4 factores homólogos fuertemente relacionados con estrés salino; que *D. hansenii* debe tener otros factores transcripcionales para la activación de estos factores está asociada con la

respuesta para almacenar glicerol durante un choque osmótico en la levadura (Rep *et al.*, 2000; Hirata *et al.*, 2003). Aunque también la expresión de los genes en estos medios puede ser debido al factor Yap1 mencionado anteriormente. Puesto que a las condiciones en estos medios, es decir salino y oxidante, ambos estarían activos y ya que se ha demostrado que son independientes uno del otro (Gash *et al.*, 2000) podemos hablar de una acción sinérgica (Komili y Silver, 2008), sin embargo en este trabajo no se observó este tipo de comportamiento, sugiriendo otro tipo de regulación, probablemente con otros factores transcripciones que sean específicos para *D. hansenii* o bien a modificaciones postranscripcionales.

Por otra parte suponemos que los factores de transcripción Gat1 y Gln3, están más involucrados en el medio con escasas de nitrógeno, es decir aquel que tiene como única fuente de nitrógeno a 3-NT, ya que los otros medios poseen una base YPD, por lo tanto tienen una alta disponibilidad de fuentes de nitrógeno. Debido a que estos factores son suprimidos por factores como Ure2, sensible al cambio de fuentes de nitrógeno de fácil o difícil asimilación.

Gat1 y Gln3 presentan cierta homología, aunque se ha reportado que en ocasiones cada uno puede activar genes diferentes, por otra parte también ha sido reportado que ambos pueden actuar sobre la activación de un solo gen (Coffman *et al.*, 1995; Magasanik, 2005; Georis *et al.*, 2009).

Entre los genes que no mostraron diferencia significativa tenemos que DEHA2G08162g y DEHA2D17446g los cuales codifican para proteínas cuya función más probable es de óxido reductasas. Estas proteínas son de suma importancia ya que participan en una gran cantidad de reacciones de transferencia de electrones. En su mayor parte son usados para la oxidación de nutrientes y su posterior utilización en la cadena de transporte de electrones (Xu, 2005).

En el caso de las flavo-monoxigenasas es decir los genes DEHA2E24178g y DEHA2C00286g, se sabe que este tipo de enzimas no solo están centradas en la oxidación-reducción de compuestos nitro-aromáticos, ya que se han reportado en procesos de regulación, donde actúan en reacciones como hidroxilación y oxidación en compuestos aromáticos citotóxicos, sino que también están relacionadas con mantener un balance redox en la célula y en su gran mayoría se han asociado con el citocromo p450, ayudando de manera importante a la oxidación de algunas moléculas dentro de la cadena de transporte de electrones (Berkel *et al.*, 2006; Arora *et al.*, 2010)

Por el contrario al evaluar los genes DEHA2C03036g y DEHA2C1478g sí encontramos que hay un incremento significativo de su transcripción en la condición de estrés por 3-NT. Primeramente debemos observar que hay factores de transcripción que se comparten entre estos genes y los que mantuvieron la misma expresión en todos los medios, lo cual sugiere que estos están regulados por otros factores que aún no se hayan caracterizado en levaduras, pensamos que como muestra de ello es que el aumento se observó únicamente en el medio que tenía a 3-NT como única fuente de nitrógeno. Esto es una buena señal, ya que como se ha descrito la respuesta genética es específica y se da con diferente intensidad y duración para cada uno de los ambientes estresantes (Gash, *et al.*, 2000; Komili y Silver, 2008).

Suponemos que al haber una formación natural de la 3-NT en los medios YPD, YPD NaCl 1M y 2M, estos genes deben activarse de manera basal para degradarla, como se observa en los resultados, lo cual es consistente con su relación con el factor Yap1 que tiene relación con el promotor de estos genes, sin embargo, el medio el cual no posee ninguna otra fuente de nitrógeno a parte de la 3-NT a diferencia del resto que tienen una base de YPD, la respuesta para la degradación de la 3-NT debe ser mucho más eficaz y rápida para poder desarrollarse ya que esta sería su única fuente de nitrógeno, por lo que la

expresión de la nitrorreductasa en este medio sería crucial. Debido a los resultados estos genes DEHAC14784g y DEHAC03036g son buenos candidatos para su estudio en mecanismos de la detoxificación de la 3-NT.

Conclusiones

- ***Debaryomyces hansenii* es capaz de usar a la 3-nitrotirosina como única fuente de nitrógeno durante su crecimiento.**
- **Aunque los genes DEHA2G08162g, DEHAD17446g, DEHAE24178g y DEHAC0028g no mostraron una diferencia significativa en su expresión basal con respecto al control, no se puede descartar que estos están involucrados en el mantenimiento de la homeostasis celular en *Debaryomyces hansenii*.**
- **Los genes DEHA2C14784 y DEHA2C03036 mostraron un aumento significativo en el medio con 3-NT, por lo que son buenos candidatos para continuar la investigación de la detoxificación de este compuesto.**

Bibliografía.

Anderson E, Kypson A, Rodriguez E, Anderson C, Lehr E y Neuffer P. (2009). Substrate-Specific Derangements in Mitochondrial Metabolism and Redox Balance in Atrium of Type 2 Diabetic Human Heart. *National Institutes of Health* 54: 1891-1898

Arora P, Srivastava A y Singh VP. (2010). Application of Monooxygenases in Dehalogenation, Desulphurization, Denitrification and Hydroxylation of Aromatic Compounds. *Journal Bioremed Biodegrad.* 1:2155-6199.

Beckman J y Koppenol W. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Journal Physiology.* 271: 1424-1437.

Berkel W, Kamerbeek N y Fraaije M. (2006). Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *Journal of Biotechnology.* 124: 670-689

Breuer U y Harms H. (2006). *Debaryomyces hansenii* an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast.* 23: 415-437.

Calderón-Torres M, Castro D, Montero P y Peña A. (2011). DhARO4, induction and tyrosine nitration in response to reactive radicals generated by salt stress in *Debaryomyces hansenii*. *Yeast.* 10:733-746.

Chao H, Yung-fu Y, Ku MSB. (2009). Characterization of a salt-induced DhAHP, a gene coding for alkyl hydroperoxide reductase, from the extremely halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *BioMed Central Microbiology.* 9:182-192.

Coffman J, Rai R, Cunningham T, Svetlov V y Cooper T. (1996). Gat1p, a GATA Family Protein Whose Production Is Sensitive to Nitrogen Catabolite Repression, Participates in Transcriptional Activation of Nitrogen-Catabolic Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology.* 16: 847-858

Drew B y Leeuwenburgh C. (2002). Aging and the Role of Reactive Nitrogen Species. *New York Academy. Sci.* 959: 66–81.

Drögue W. (2002). Free Radicals in the physiological control of cell function. *Physiology Review.* 82: 47-95.

Feng Xu. (2005) Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Industrial Biotechnology.* 1:38-50

Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery R y Schulz R. (2000). Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circulation Research*. 87:241-247.

García Velázquez A. M. (2012). Análisis de la actividad antioxidante del extracto de *Rosmarinus officinalis* L. en hígado de ratas Wistar expuestas a tetracloruro de carbono. Tesis que para obtener el Título de Licenciado en Ingeniería Bioquímica. Centro Universitario de los Lagos, Universidad de Guadalajara. 72p.

Gasch A, Spellman P, Kao C, Carmel-Harel O, Eisen M, Storz G, Botstein D y Brown P. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*. 11: 4241-4257.

Georis I, Feller A, Vierendeels F y Dubois E. (2009). The Yeast GATA factor Gat1 occupies a central position in nitrogen catabolite repression-sensitive gene activation. *Molecular and Cellular Biology*. 29:3803-3815

Halliwell B. (2001). Free Radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of Life Sciences*. 4:1-7

Halliwell B y Gutteridge J. (2007). Free radicals in biology and medicine. (4ed). Editorial Oxford. Pp: 22-25, 23-60, 81-90, 187-188.

Hirata Y, Andoh T, Asahara T y Kikuchi A. (2003). Yeast glycogen synthase Kinase-3 activates Msn2p dependent transcription of stress responsive genes. *Japan Molecular Biology of the Cell*. 14: 302-312

Ju K y Parales R. (2010). Nitroaromatic compounds, from synthesis to biodegradation. *microbiology. Molecular Biology Review*. 74(2):250-265

Kamat J. (2006). Peroxynitrite: A potent oxidizing and nitrating agent. *Indian Journal of Experimental Biology*. 44:436-444

Komili S y Silver P. (2008). Coupling and coordination in gene expression processes: a systems biology view. *Nature Reviews Genetics*. 9:38-49

Kuge S, Jones N y Nomoto A. (1997). Regulation of Yap-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *The European Molecular Biology Organization Journal* .16:1710–1720.

Magasanik B. (2005) The transduction of the nitrogen regulation signal in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* 102:16537–16538.

Maldonado O, Jiménez V, Guapillo V, Ceballos G y Méndez E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revision Medica*. 24: 33-39.

Marques I, Bonatto D y Henriques P. (2010). Nitroreductases: enzymes with environmental, biotechnological and clinical importance. *Current research*. 24: 1008-1019

Montero-Peñaloza P. A. (2012). Estudio bioquímico de los aminoácidos tirosina y triptófano como blancos de oxidación durante el estrés salino en la levadura *Debaryomyces hanseni*. Tesis para obtener el título de Químico-Farmacéutico-Biólogo. Facultad de química. UNAM, México. 63p

Nishino S y Spain C. (2006). Biodegradation of 3-Nitrotyrosine by *Burkholderia* sp. Strain JS165 and *Variovorax paradoxus* JS171. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 1040-1044.

Rep M, Krantz M, Thevelein J y Hohmann S. (2000). The Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Osmotic Shock. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 8290-8300.

Ronson R, Nakamura M y Vinten-Johansen J. (1999). The cardiovascular effects and implications of peroxynitrite. *Cardiovascular Research*. 44: 47 –59.

Rep M , Krantz M , Thevelein J y Hohmann S. (2000). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 8290-8300.

Vigliotta G, Di Giacomo M, Carata E, Massardo D, Tredici S, Silvestro D, Paolino M, Pontieri P, Del Giudice L, Parente D y Alifano P. (2007). Nitrite metabolism in *Debaryomyces hanseni* TOB-Y7, a yeast strain involved in tobacco fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75: 633-645.