



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Posgrado en Ciencias Biológicas

Análisis del codón CUG alternativo de *Debaryomyces hansenii*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Daniel Ochoa Gutiérrez

TUTORA PRINCIPAL

Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky

Facultad de Ciencias

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella

Instituto de Biotecnología

Dr. Luis David Alcaraz Peraza

Facultad de Ciencias

Ciudad Universitaria, CDMX, Abril 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Posgrado en Ciencias Biológicas

Análisis del codón CUG alternativo de *Debaryomyces hansenii*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Daniel Ochoa Gutiérrez

TUTORA PRINCIPAL

Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky

Facultad de Ciencias

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella

Instituto de Biotecnología

Dr. Luis David Alcaraz Peraza

Facultad de Ciencias

Ciudad Universitaria, CDMX, 2023

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
OFICIO FCIE/DAIP/134/2023
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité de Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de noviembre de 2022 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTOR EN CIENCIAS del estudiante OCHOA GUTIÉRREZ DANIEL con número de cuenta 305501295 con la tesis titulada: “Análisis del codón CUG alternativo de *Debaryomyces hansenii*”, realizada bajo la dirección de la DRA. CLAUDIA ANDREA SEGAL KISCHINEVZKY:

Presidente:	DRA. MARÍA ALICIA GONZÁLEZ MANJ ARREZ
Vocal:	DRA. MARÍA SOLEDAD FUNES ARGÜELLO
Vocal:	DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Vocal:	DR. JESÚS AGUIRRE LINARES
Secretario:	DR. LUIS DAVID ALCARAZ PERAZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MIRAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 10 de marzo de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM. La casa de estudios más grande de Latinoamérica.

Al PAPIIT por el apoyo económico brindado al laboratorio bajo los proyectos “Estudio de la regulación de la expresión de los genes que codifican para las superóxido dismutasas y catalasas en la levadura eurihalina *Debaryomyces hansenii*” con número de proyecto PAPIIT-IN225320 y “Levaduras antárticas como materia prima en la producción de biodiésel: selección, optimización y caracterización de cepas oleaginosas” con número de proyecto PAPIIT-IA208820

Al CONACyT y el apoyo económico que me brindó durante todo el proyecto de Doctorado con el CVU 554734.

A los miembros de mi comité tutor: el Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella del Instituto de Biotecnología y el Dr. Luis David Alcaraz Peraza de la Facultad de Ciencias por sus contribuciones y comentarios a este proyecto. Y a la Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky por su asesoría constante y apoyo.

Agradecimientos a título personal

Agradecimientos formales:

A la Quím. Viviana Escobar Sánchez por su ayuda en el laboratorio y por el apoyo técnico que me brindó, además de las facilidades en cuanto al material del laboratorio.

A mis sinodales, por el tiempo que dedicaron para leer mi trabajo y por sus valiosos comentarios. Y al Dr. James González por su apoyo con la escritura del artículo.

A la M. en C. Andrea V. Cervantes Ayala por su aportación en los análisis del RT q-PCR y al M. en C. Cristóbal A. Hernández Álvarez por su aportación con la curación de los datos para el análisis de secuencias.

A la M. en C. Ileana de la Fuente Colmenares por compartir sus datos para determinar las condiciones de estrés ante un choque de peróxido y por su apoyo y diseño de imágenes tan bonitas.

A la Biol. Anya Miranda Reyes Torres por confiar en mi como su tutor y por continuar con el desarrollo de este trabajo en su licenciatura y en su próxima maestría.

Agradecimientos no formales

Esta tesis está dedicada a mis abuelos Tito y Tita. Gracias porque, con su inmenso afecto y cariño, forjaron las bases para desarrollar una familia tan amorosa; una que me ha apoyado durante toda mi vida para conseguir cada una de mis metas. Aquí siguen, nunca se han ido.

A mi Mamá por ser el arquetipo de la maternidad, una mujer que me ha enseñado a no rendirme nunca, a sentirme orgulloso de lo que soy y a seguir toda la vida luchando por el amor, la conciencia y la libertad con rebeldía y resistencia. Lo logré mamá, ya soy Doctor como tú.

A mi Papá por ser un modelo de perseverancia y de reflexión constante. Por su apoyo tenaz durante tantos años y por siempre buscar ayudarme a que sea feliz y esté tranquilo en mi vida. Gracias por ayudarme a ser lo que yo quiero ser siempre. Lo logré papá, ya soy Doctor como tú.

A mis hermanitxs que siempre me van a hacer el día cuando lxs veo o les hablo, gracias por tanto cariño y tantas formas de expresarlo. A mis primxs Sofi, Miranda, Esteban, Bruno, Nico, Mequi, Ale, Karla, Yek, Rodrigo, Ricardo, Rodolfo y Arturo, y a sus hijos que ya son muchos. Para que sigamos riendo de la vida que sólo hay una, y en esa están todxs ustedes.

A mis tíxs Lina, Vero y Horacio, por el amor, las aventuras y las risas que hemos tenido. A Silvia por el cariño que le ha tenido a mi papá, a mis hermanxs y a mí. Y a mi abuelita y sus hijxs por estar siempre presentes.

A Yoshira, por ser la luz que ilumina mi camino, el mar que me acompaña constantemente y que ha atravesado las fibras de mi ser con su escucha, su reflexión, su arte y su mirada. Gracias por siempre estar ahí, abrazarme, confiar en mí y mantenerte al pie de lucha conmigo para cambiar este mundo juntxs con ternura, pasión, amor, y empatía.

A Andrea, por su amor y dulzura persistentes. Gracias por ser la chaparrita grandotota que me ayuda siempre a seguir adelante y a organizar mi mente cuando más lo necesito. Gracias por siempre darme paz, tranquilidad, felicidad, satisfacción y conducir mis pensamientos y nutrir mi corazón hacia un sendero lleno de flores.

A todxs aquellxs que se pueden llamar amigxs o acompañantes de esta vida: Juan Pablo, Juan, Gaby, Karen, Alba, Vane, Mariana Rivero, Mariana Pecas, Mariana Murueta, Brandon, Jorge, Tat, Miranda, Mel, Lucía, Poncho, Jani, Diana, Anita y Regis; por su amistad y cariño constante durante todos estos años. La sufrimos bastante, pero las risas no faltaron.

A Clau, por creer en mí y confiar siempre en mi juicio y en mis capacidades. Por creer en un proyecto tan loco que a veces ni ella ni yo entendíamos. Gracias por ser la mejor tutora y guía que cualquier científicx puede desear.

Y también, gracias a toda la gente hermosa con la que he hecho magia jugando futbol o tochito, con la que he bailado alguna rolita sabrosa, con la que hemos hecho la locura de filmar cortometrajes, con la que he experimentado las frías pero reconfortantes ilusiones de la ciencia en un laboratorio, con la que he estado en la playa viendo un atardecer con una buena cerveza o un buen mezcal, con la que he aprendido tanto mientras me escuchan dentro de un salón de clases, y gracias a cualquiera que me haya dejado un poco de su corazón, de su mente o de su tiempo en tantos lugares que he estado durante todo este proceso. Sobrevivimos a una pandemia y somos merecedorxs de un mundo mejor.

A tita y a tito, que no se fueron nunca,
sólo están ahora en muchos lugares al mismo tiempo

Así, para los seres humanos
como para todos los organismos vivos,
el futuro es radicalmente imprevisible.
Eso significa que poseemos la facultad
de construir nuestros propios futuros,
aunque en circunstancias que no elegimos.
Y, por lo tanto, es nuestra biología la que nos hará libres.

Steven Rose

Índice

1. Resumen	1
1. Abstract	2
2. Introducción	3
2.1 <i>Debaryomyces hansenii</i> : una levadura no convencional	3
2.2 Las desviaciones del código genético	4
2.3 Las aminoacil-tRNA sintetasas	5
2.4 La secuencia del tRNA y su importancia en la ambigüedad	6
2.5 Las levaduras del clado CTG	8
2.6 El codón CUG en condiciones de estrés	10
3. Objetivos e Hipótesis	12
3.1 Objetivo general	12
3.2 Objetivos particulares	12
3.3 Hipótesis	12
4. Materiales y metodología	13
4.1 Análisis de secuencias <i>in silico</i>	13
4.2 Cultivo de cepas	13
4.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	14
4.4 Curvas de crecimiento	14
4.5 Extracción de RNA y síntesis de cDNA	14
4.6 RT-qPCR	15
4.7 Propiedades fisicoquímicas de las proteínas	16
5. Resultados	17
5.1 Análisis de secuencias	17
5.1.1 Análisis de secuencias de las aminoacil-tRNA sintetasas	17
5.1.2 Análisis de elementos del promotor	17
5.1.3 Conservación de la secuencia y de la estructura del tRNA _{CAG} en el clado CTG-Ser1	18
5.2 Modificaciones en el fenotipo de colonia, ultraestructura y la tasa de crecimiento en <i>D. hansenii</i> bajo condiciones de estrés	21
5.2.1 Modificaciones del fenotipo de colonia por estrés	21
5.2.2 Curvas de crecimiento en diferentes condiciones de NaCl y pH	21
5.2.3 Microfotografías de la ultraestructura celular en cultivos de <i>D. hansenii</i> bajo condiciones de estrés	22
5.3 Expresión diferencial de los genes implicados en la ambigüedad del codón CUG de <i>D. hansenii</i>	24
5.3.1 Diseño de desoxiligonucleótidos y extracción de RNA	24
5.3.2 RT-qPCR del gen de referencia para estandarización	27
5.3.3 RT-qPCR de los genes implicados en la ambigüedad del codón CUG de <i>D. hansenii</i>	29
5.4 Análisis proteómico y de de vías metabólicas implicadas en la ambigüedad de codones	31
6. Discusión	38
7. Conclusiones	47
8. Perspectivas	49
9. Referencias bibliográficas	51
Anexo 1	62
Anexo 2	65
Artículo de investigación publicado	65

Abreviaturas

Ser	Serina
Leu	Leucina
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
tRNA _{CAG}	Ácido ribonucleico de transferencia con anticodón CUG
tRNA ^{Ser}	Ácido ribonucleico de transferencia para Serina
tRNA ^{Leu}	Ácido ribonucleico de transferencia para Leucina
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
ATP	Adenosín trifosfato
AMP	Adenosín monofosfato
PPi	Pirofosfato inorgánico
DO	Densidad óptica
LeuRS	Leucil-tRNA sintetasa
SerRS	Seril-tRNA sintetasa
aaRS	Aminoacil-tRNA sintetasa
LeuRScyt	Leucil-tRNA sintetasa citoplasmática
LeuRSmit	Leucil-tRNA sintetasa mitocondrial
SerRScyt	Seril-tRNA sintetasa citoplasmática
SerRSmit	Seril-tRNA sintetasa mitocondrial
DhRPS3	Proteína ribosomal S3 de <i>Debaryomyces hansenii</i>
YPD	Extracto de levadura-Peptona-Dextrosa
Cq	Ciclo de fluorescencia
ROS	Especies reactivas de oxígeno
NaCl	Cloruro de Sodio
pH	Potencial de hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico

1. Resumen

Debaryomyces hansenii es una levadura extremófila que pertenece al clado CTG-Ser1. Las levaduras de este clado tienen la capacidad de traducir de forma ambigua el codón CUG como Serina (Ser) o como Leucina (Leu). La capacidad de codificar a dos aminoácidos de esta manera, permite que los organismos expandan su diversidad proteómica, sin embargo, se conoce poco sobre los mecanismos de regulación que guían la lectura de los codones como uno u otro aminoácido y la potencial adaptación que pueda surgir de este proceso. En este trabajo se examinó la estructura de las secuencias génicas del tRNA_{CAG} de los organismos del clado CTG-Ser1 para analizar la presencia de los elementos conservados que permiten traducir al codón CUG de forma ambigua. También se demostró la repercusión tanto en el fenotipo como en la ultraestructura celular cuando, en particular, *D. hansenii* se encuentra en condiciones de estrés. En estas condiciones se encontró una expresión diferencial de los genes tRNA^{Ser}, tRNA^{Leu}, tRNA_{CAG}, LeuRS, y SerRS en fase de crecimiento logarítmica y estacionaria, que podrían estar involucradas en el proceso adaptativo de esta levadura. Propongo que la traducción ambigua y la leucilación o serinación de los residuos aminoproteicos codificados por el codón CUG está regulada transcripcionalmente, y que esto puede jugar un papel importante en la adaptación de *D. hansenii* a ambientes extremos

1. Abstract

Debaryomyces hansenii is an extremophilic yeast belonging to the CTG-Ser1 clade. Yeasts of this clade have the ability to ambiguously translate the CUG codon as either Serine (Ser) or Leucine (Leu). The ability to encode two amino acids in this manner allows these organisms to expand their proteomic diversity and enhance their adaptive capacity, but little is known about the regulatory and adaptive mechanisms they possess. The structure of the tRNA_{CAG} gene sequences of organisms of the CTG-Ser1 clade was examined to analyze the presence of conserved elements that allow ambiguous translation of the CUG codon. The stress conditions to which *D. hansenii*, in particular, is tolerant and their impact on both its phenotype and ultrastructure were also demonstrated. Under these conditions, in addition, differential expression of tRNA^{Ser}, tRNA^{Leu}, tRNA_{CAG}, LeuRS, and SerRS genes was found in logarithmic and stationary growth phase, which could be involved in the adaptive process of the yeast. In this work we propose that ambiguous translation and leucylation or serination of the amino protein residues encoded by the CUG codon are transcriptionally regulated and that this may play an important role for *D. hansenii* in adaptation to extreme environments.

2. Introducción

2.1 *Debaryomyces hansenii*: una levadura no convencional

Debaryomyces hansenii es una levadura no convencional perteneciente a la familia *Saccharomycetaceae*. Es un organismo con gran potencial biotecnológico gracias a su capacidad de sobrevivir a ambientes extremos de salinidad y pH (Breuer & Harms, 2006; Gori et al., 2012; Prista et al., 2016). Es halotolerante ya que crece en condiciones estándar en cultivos con 0.6 M de NaCl y puede ser cultivada en medios que contengan incluso hasta 4 M de NaCl. Además, es capaz de crecer en un rango de pH desde 3 hasta 10 y soportar temperaturas bajo cero (Gonzalez et al., 2009; Navarrete et al., 2009; Prista et al., 2007; Ramos-Moreno et al., 2019; Sánchez et al., 2018; Segal-Kischinevzky et al., 2011). *D. hansenii* también puede sobrevivir ante condiciones de estrés oxidante producido por especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (González et al., 2020; Jamieson, 1998).

Hasta el momento se sabe poco sobre los mecanismos celulares que tiene *D. hansenii* para contender contra todos estos tipos de estrés. La actividad de las superóxido dismutasas, las catalasas, las peroxidasas y las tiorredoxinas, parecen jugar un papel central en la descomposición de las ROS intracelulares que se acumulan durante la respiración celular y ante las condiciones de estrés salino (Navarrete et al., 2009; Ramos-Moreno et al., 2019; Segal-Kischinevzky et al., 2011; Skoneczny & Rytka, 2000), sin embargo, la capacidad de mantener la homeostasis celular ante cambios de pH no ha podido ser asociada con la actividad de estas proteínas (Mortensen et al., 2008). Recientemente, se ha buscado entender los mecanismos que subyacen diversas respuestas a estrés a través de evaluar los patrones de expresión, por ejemplo, se han analizado por microarreglos a partir de muestras en condiciones de pH alcalino y altas concentraciones de salinidad encontrándose que los genes relacionados con la producción de energía, ciclo celular y transcripción celular están regulados negativamente en estas condiciones (Sánchez et al., 2018).

D. hansenii posee un genoma de 12.6 Mb, con 6906 secuencias de proteínas codificantes repartidas en seis cromosomas, con una redundancia del 49.2% y con una capacidad de codificación del 79.2%, una de las más altas reportadas para levaduras. Tiene el mayor número de genes que codifican tRNA conocidos en una levadura, 205 genes para 43 tipos de tRNA (Breuer & Harms, 2006). De acuerdo con la secuencia del rRNA 18S se le ha agrupado dentro del clado CTG-Ser1, el mismo al cual pertenece la levadura modelo *Candida albicans* (Kawaguchi et al., 1989; Krassowski et al., 2018; Suzuki et al., 1997). La propuesta de este proyecto es analizar la alternancia de codones que tiene este grupo de

levaduras y asociarlo con los componentes moleculares que le permiten a *D. hansenii* adaptarse a diferentes condiciones de estrés.

2.2 Las desviaciones del código genético

Desde 1955 Francis Crick predijo la existencia de un adaptador que permitiría la traducción de una secuencia de ácidos nucleicos a aminoácidos; tres años después fue descubierto el primer tRNA. En una carrera por descubrir la relación completa de aminoácidos con su codón correspondiente, Robert W. Holley, Har Gobind Khorana y Marshall W. Nirenberg descifraron en 1966 el código genético basado en la asociación de los 64 codones de RNA que correspondían a los 20 aminoácidos, descubrimiento que les valió la posibilidad de recibir el premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1968 (Lant et al., 2019).

En ese mismo año, Crick postuló que este código genético debía ser universal e inmutable, ya que una alteración en el código podría ser perjudicial para la vida de cualquier organismo (Moura et al., 2010). Sin embargo, para entonces, ya se habían identificado excepciones al código genético y, durante los últimos 50 años, se han descubierto tantas alteraciones que permiten reconsiderar la universalidad e inflexibilidad del código. En 1968, John F. Atkins identificó la primera excepción al descubrir un cambio de marco de lectura en *Salmonella typhimurium*. Desde entonces, se ha observado que, en organismos pertenecientes a todos los reinos, desde bacterias hasta seres humanos, es posible encontrar modificaciones en el código genético: codones codificados de forma ambigua, codones reasignados para otro aminoácido y codones que utilizan aminoácidos distintos a los 20 aminoácidos estándar (Lant et al., 2019).

Durante la síntesis de proteínas hay varios puntos de control donde la ambigüedad de codones puede ocurrir, no necesariamente desencadenados por un error en los mecanismos de verificación o de carga, sino como una forma de adaptación por la diversificación de la variabilidad proteica (Hoffman et al., 2017; Mohler & Ibba, 2017; Reynolds et al., 2010). A este proceso se le llamó inicialmente mala-traducción debido a la falta de correspondencia con el código genético “universal” y se ha descrito en diferentes clados de los tres dominios conocidos como respuesta a un cambio en la temperatura, a la presencia de agentes tóxicos y al cambio en el pH en el medio (Chan et al., 2012; Javid et al., 2014; Meyerovich et al., 2010; Pang et al., 2014; M. H. Schwartz & Pan, 2016).

En el proceso de traducción están implicadas las aminoacil-tRNA sintetasas (aaRS), los tRNA, los factores de elongación de la traducción (EFs) y los ribosomas (Hoffman et al., 2017; Mohler & Ibba, 2017; Reynolds et al., 2010). Comúnmente, el proceso de síntesis es el siguiente: Las aaRS se unen al aminoácido correspondiente (también llamado cognado) utilizando ATP, que es hidrolizado a AMP tras la liberación de PPi. Después, el tRNA

correspondiente es elegido por la aaRS para ligarlo al aminoácido. Seguido de esto, los EFs reconocen al tRNA cargado con su aminoácido cognado y lo transportan hacia el ribosoma. Por último, el ribosoma reconoce al tRNA con su aminoácido unido al EF, verifica que el anticodón del tRNA corresponda al codón del mensajero y lleva a cabo la formación del enlace peptídico (Berg et al., 2018; Hoffman et al., 2017; Mohler & Ibba, 2017; Reynolds et al., 2010) (Fig. 1A).

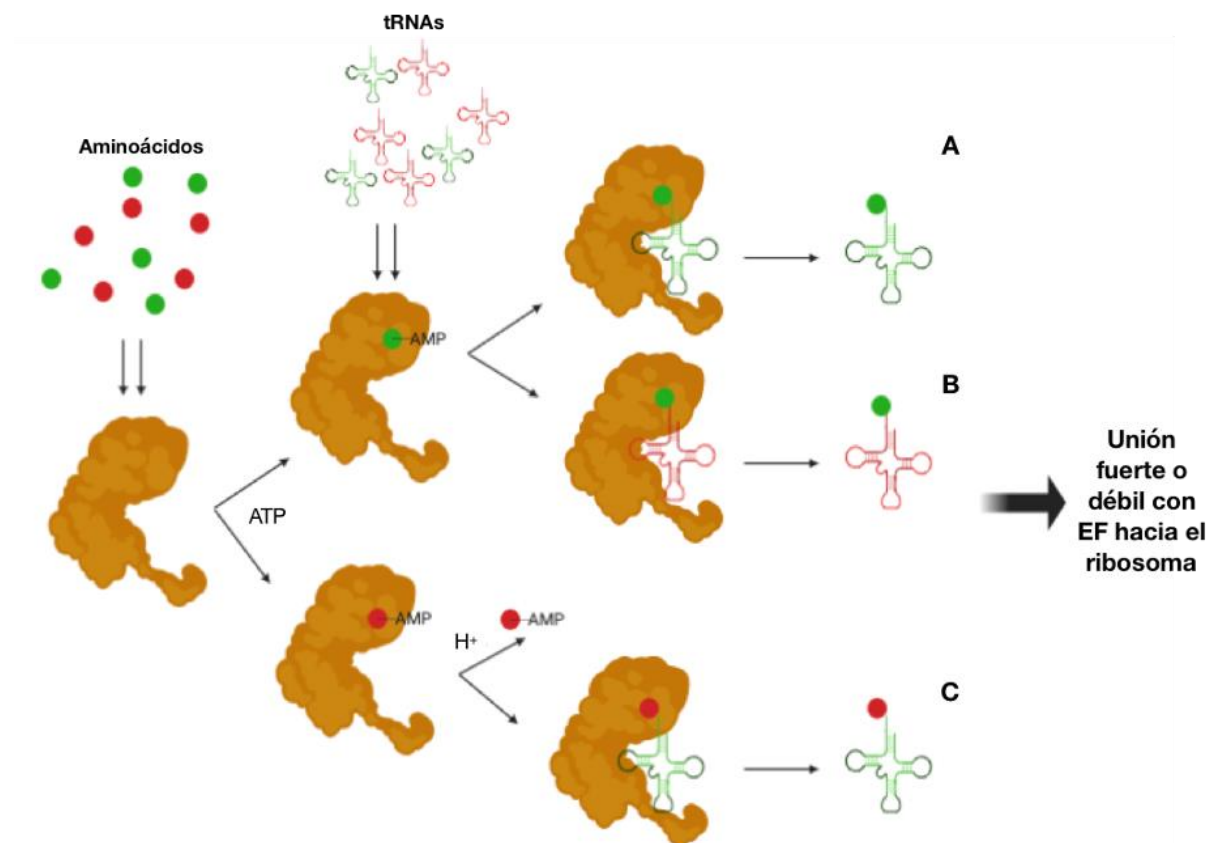


Figura 1. Proceso de carga de los tRNA por las aaRS. A) Cargado canónico del tRNA con su aminoácido cognado. B) Cargado distinto por el reconocimiento del tRNA no correspondiente. C) Cargado distinto por el reconocimiento del aminoácido no correspondiente. Aminoácidos y tRNA cognados en verde. Aminoácidos y tRNA no cognados en rojo. Creado con biorender.com.

En cada uno de los pasos existen mecanismos de regulación y “corrección de errores” que moderan el proceso que sucede durante la síntesis de proteínas.

2.3 Las aminoacil-tRNA sintetetasas

Las aaRS son las encargadas de comenzar el proceso de síntesis de proteínas y son el primer punto de control de la traducción ambigua. Se dividen en dos tipos: las aaRS tipo I contienen dos secuencias consenso –HIGH y KMSKS– que se encargan de interactuar con el ATP. Las aaRS tipo II tienen un dominio peculiar de siete láminas beta plegadas en antiparalelo que se

encargan de esta interacción. El ATP, una vez colocado en el sitio catalítico de la aaRS, reconoce al aminoácido correspondiente y realiza un ataque nucleofílico que lo activa para producir un aminoacil-adenilato. En un segundo paso, el aminoácido activado es transferido al 2' OH de la adenina 5'-76 del tRNA, en el caso de las aaRS de tipo I, y al 3' OH de la adenina 5'-76 del tRNA, en el caso de las aaRS de tipo II (Berg et al., 2018; Pang et al., 2014).

Uno de los grandes problemas a los que se tienen que enfrentar las aaRS es la similitud en la estructura de ciertos aminoácidos. Ile y Val, por ejemplo, difieren sólo por un grupo metilo que promueve errores en la discriminación del aminoácido por la IleRS en hasta 1% de las veces (M. Schwartz & Pan, 2017). De igual forma la AlaRS tiene problemas para discriminar entre Ala, Ser y Gly debido a la topología de estos aminoácidos y al espacio físico del sitio activo de la AlaRS (Mohler & Ibba, 2017).

Para evitar esto, algunas aaRS tienen mecanismos de edición que liberan al aminoácido mal cargado. Tanto la IleRS como la AlaRS, y muchas otras aaRS más, tienen mecanismos de hidrólisis pre-transferencia en donde se libera el AMP unido al aminoácido no correspondiente previo a la unión con el tRNA (Mohler et al., 2017; Mohler & Ibba, 2017; Reynolds et al., 2010) (Fig. 1B).

Si el tRNA ya se ha unido con el aminoácido no cognado, existe un segundo mecanismo post-transferencia en donde la D-aminoacil-tRNA deacilasa se encarga de hidrolizar el enlace éster del tRNA con el aminoácido. Esto desplaza al aminoacil-adenilato hacia el sitio de edición por un cambio conformacional de la aaRS, donde será hidrolizado por el mecanismo de pre-transferencia (Mohler & Ibba, 2017; Reynolds et al., 2010) (Fig. 1C).

Las aaRS también pueden incorporar más de 35 aminoácidos no proteicos en la secuencia de las proteínas (Bullwinkle et al., 2014; Wiltschi, 2016). Uno de los más estudiados es la norvalina, un derivado de la síntesis de Leu. La LeuRS no puede diferenciar eficientemente entre estos aminoácidos y puede colocar la norvalina en el tRNA^{Leu}. Esto provoca que en *E. coli*, en condiciones anaeróbicas, se presente hasta un 10% de las veces en las proteínas traducidas (Cvetesic et al., 2016). Las proteínas con norvalina son funcionales e incluso se ha propuesto que ayudan a la sobrevivencia de la bacteria en esta condición (Bullwinkle et al., 2014; Cvetesic et al., 2016).

2.4 La secuencia del tRNA y su importancia en la ambigüedad

Los tRNA son secuencias pequeñas de 76 a 90 nucleótidos que poseen regiones esenciales para su función: el tallo del aminoácido, en el que interactúan tanto el inicio como el final de la secuencia y en donde se encuentra el sitio conservado 3'-CCA al que se une el aminoácido correspondiente; los brazos D y T que promueven el correcto plegamiento del tRNA; el

anticodón entre los nucleótidos 34 a 36 que se encuentra en el tallo contrario al del aminoácido; y el brazo variable en donde el tRNA es reconocido por ciertas aaRS para su cargado (Lant et al., 2019; Pang et al., 2014). Los tRNA componen entre el 4 y el 10% del RNA total de una célula. Debido a su función, la regulación de su biosíntesis, modificación y degradación, impactan directamente sobre la traducción de la secuencia de los RNA mensajeros (Mohler et al., 2017).

El 3'- CCA es esencial para la aminoacilación del tRNA y generalmente, aunque no siempre, es añadido después de la transcripción por una tRNA nucleotidil transferasa (Hoffman et al., 2017). Este proceso, junto con el plegamiento tridimensional, es conocido como la maduración del tRNA (Lant et al., 2019). Los nucleótidos del tRNA responsables del reconocimiento específico de una aaRS son conocidos como elementos de identidad y pueden consistir de un nucleótido específico, pares de nucleótidos o motivos estructurales más complejos (Pang et al., 2014).

El reconocimiento del tRNA por las aaRS generalmente ocurre por una combinación tanto del anticodón como de ciertos nucleótidos que se encuentran en el tallo del aminoácido y en nucleótidos cercanos al anticodón (5'- 33, 34 y 37) (Mohler & Ibba, 2017), sin embargo, existen algunas aaRS que no tienen al anticodón como elemento de identidad, tal es el caso de la SerRS, la LeuRS y la AlaRS de muchas especies (Berg et al., 2018; Pang et al., 2014). Esto permite que puedan existir variables de tRNA^{Ser}, tRNA^{Leu} y tRNA^{Ala} con anticodones distintos y que aun así sean cargados con los aminoácidos correspondientes (Pang et al., 2014). Por lo tanto, existe la posibilidad de que un tRNA con su aminoácido cognado, coloque el aminoácido en un codón que no es el establecido en el código genético "universal", solamente por la presencia de una mutación del anticodón.

Los tRNA también poseen mecanismos exhaustivos de modificación post-transcripcional en un promedio del 9 al 11% de sus bases, convirtiéndolos en los RNA mayormente modificados en la célula. Las modificaciones post-transcripcionales son esenciales para el correcto plegamiento de su estructura tridimensional y para obtener una flexibilidad y estabilidad correctas (Mohler & Ibba, 2017). La mayoría de estas modificaciones aún tienen una función desconocida, pero se ha encontrado la incapacidad de algunos tRNA de ser reconocidos por su aaRS o por el EF correspondiente cuando no existen ciertas modificaciones post-transcripcionales (Hoffman et al., 2017; Mohler & Ibba, 2017).

La diversidad de cambios en regiones específicas del tRNA (como cambios de secuencia en el brazo variable) y de modificaciones post-transcripcionales (como metilaciones o presencia de inosinas) obstaculiza la posibilidad de que el tRNA sea reconocido por su aaRS correspondiente (Lant et al., 2019). La secuencia del tRNA es fundamental para evitar el cargado de ciertos aminoácidos en una poza de tRNA y aaRS.

Las modificaciones que puedan suceder de acuerdo con las condiciones fisiológicas de la célula o la presencia de ciertos agentes externos pueden llevar al falso reconocimiento de un tRNA y a una selección distinta del tRNA o del aminoácido. Por ejemplo, los tRNA^{Leu} de *Escherichia coli* son dependientes de una unión de un grupo isopentenil a la adenina 37. Las células con la vía de modificación de esa adenina suprimida aumentan significativamente la traducción distinta de los codones de Leu (Aubee et al., 2016).

2.5 Las levaduras del clado CTG

En 1989, se reportó un clado de levaduras con reasignación del codón CUG de Leu a Ser (Gori et al., 2012). Posteriormente se describieron más de 75 especies de *Candida* y *Pichia stipites*, *D. hansenii* y *Lodderomyces elongisporus* con reasignación de este codón (Prista et al., 2016). Más adelante se planteó la reasignación del codón CUG de diferentes formas dentro de las levaduras y se reorganizaron los clados basados en la traducción de su codón CUG (Krassowski et al., 2018). Existen cinco grupos monofiléticos que pueden traducir el codón CUG como Ser, como Leu y como Ala y un grupo parafilético que traduce Leu con el código estándar. El grupo de Ala contiene a los géneros *Nakazawaea*, *Peterozyma* y *Pachysolen*. El clado más cercano a este es el Leu2 donde se encuentra la familia *Pichiaceae* e incluye a los géneros *Citeromyces*, *Kuraishia*, *Komagataella*, *Ogataea*, y *Pichia*. El clado Ser1 contiene diversos géneros de *Candida* y a *D. hansenii*. El clado Ser2 contiene sólo a los géneros *Ascoidea* y *Saccharomyopsis*. Y como grupo cercano a este está el clado Leu1 que contiene a *Saccharomyces cerevisiae* y las familias *Saccharomycetaceae*, *Saccharomycodaceae*, y *Phaffomycetaceae* (Krassowski et al., 2018) (Fig. 2).

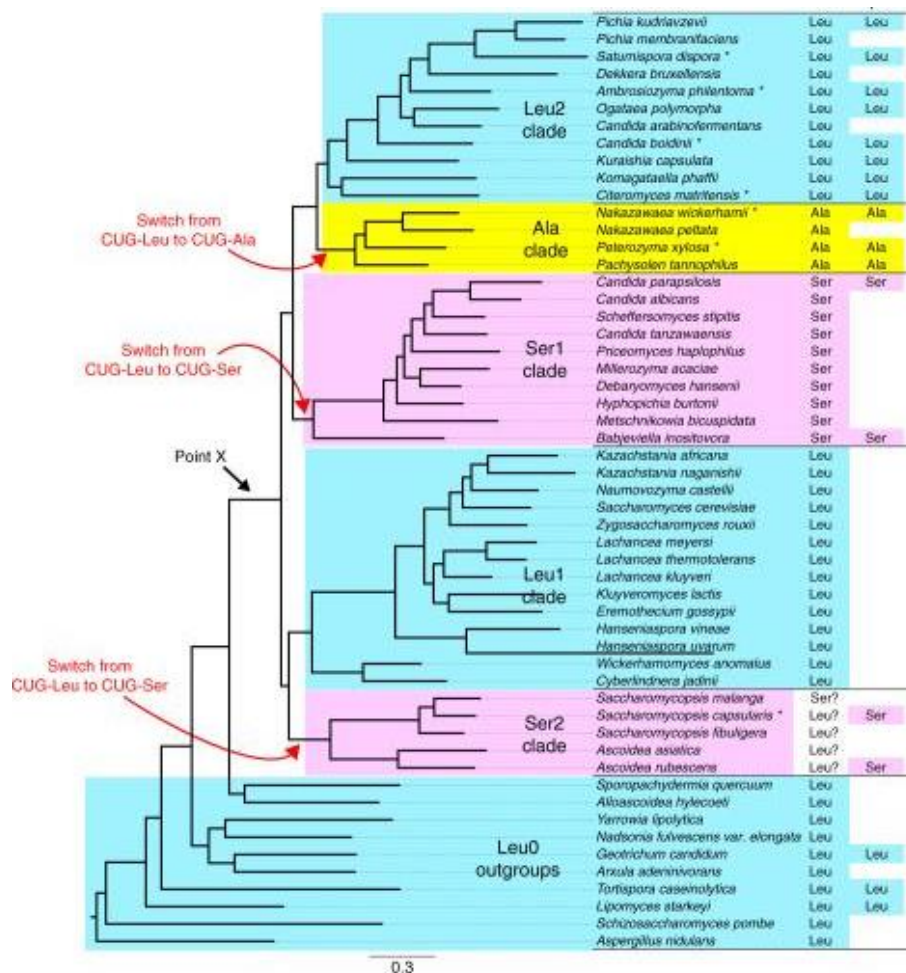


Figura 2. Árbol filogenético y decodificación del codón CUG en 52 especies de levaduras. El azul, el rosa y el amarillo indican la traducción de CUG como Leu, Ser y Ala, respectivamente. El árbol se construyó a partir de 1237 proteínas por máxima verosimilitud. Tomado de Krassowski et al., 2018.

Las levaduras pertenecientes al clado CTG-Ser1 tienen como característica genómica principal la capacidad de utilizar un código genético alterno en el que usan el codón CUG para codificar con mayor probabilidad Ser en vez de Leu. En *C. albicans* se ha demostrado que esto sucede en un rango de 3% para Leu y 97% para Ser en condiciones estándar de crecimiento. Mientras que otros organismos de este clado lo hacen exclusivamente para Ser. En *C. albicans* se ha descubierto que el tRNA de Leu con el anticodón CAG es un híbrido y tiene modificaciones en su secuencia que permiten a la SerRS y a la LeuRS reconocerlo y cargarlo con cualquiera de los aminoácidos, generando dos isoformas de este tRNA_{CAG} (tRNA_{CAG}^{Ser} y tRNA_{CAG}^{Leu}) (Kawaguchi et al., 1989; Krassowski et al., 2018; Prista et al., 2016; Suzuki et al., 1997). En este clado se ha especulado que uno o varios tRNA para Ser mutaron en la región del anticodón produciendo un tRNA que reconoce los codones CUG correspondientes a Leu en el código genético “universal” aunque originalmente era para Ser

(Lee et al., 2014; Miranda et al., 2013). Se calcula que este tRNA apareció hace 272 millones de años por la inserción de la Adenina (A) en la segunda posición del anticodón de tRNA_{CAG}^{Ser} y fue reasignado a Leu hace unos 170 millones de años (Mohler & Ibba, 2017).

2.6 El codón CUG en condiciones de estrés

Se ha descrito que la leucilación del codón CUG en *C. albicans* puede modificarse del 7% al 0.5% durante la infección dependiendo de la presencia o ausencia de leucocitos. En este organismo, la diversidad del proteoma parecería diversificarse para contender contra la respuesta inmune del humano y permitir una mayor probabilidad de infección. La manipulación artificial de la traducción del codón CUG en *C. albicans* en hasta un 28% de leucilación, provocó la expresión de factores de virulencia y modificó la capacidad de adhesión, generó un cambio fenotípico, morfogénesis y producción de hidrolasa extracelular (Moura et al., 2010; M. A. S. Santos et al., 2011).

C. albicans posee dos aaRS para cargar el aminoácido Ser y dos aaRS para cargar el aminoácido Leu y se han nombrado por su origen filogenético como SerRScyt y SerRSmit y LeuRScyt y LeuRSmit, siendo las “cyt” de origen eucariótico y las “mit” de origen procariótico. Las estructuras de la SerRScyt y la LeuRScyt han sido reportadas y se han encontrado características en las secuencias que permiten la unión de estas proteínas con el tRNA_{CAG}. El extremo N-terminal de SerRScyt parece ser importante para el reconocimiento de este tRNA, mientras que en la LeuRScyt pareciera ser el extremo C-terminal el que cumple esta función. Normalmente, las dos tienen la misma afinidad por el tRNA_{CAG} *in vitro*, sin embargo, *in vivo* hay una preferencia significativa de SerRScyt sobre LeuRScyt (Ji et al., 2016; Rocha et al., 2011). LeuRScyt también exhibe una misma afinidad de leucilación por los tRNA^{Leu} y por el tRNA_{CAG} híbrido (Ji et al., 2016), sugiriendo que debe haber otro proceso regulatorio que evita el cargado 50/50% de leucilación y de serinación del tRNA_{CAG}. Todos estos datos indican que muy posiblemente exista una regulación a nivel transcripcional que también esté jugando un papel importante en la capacidad de leucilación o serinación de las proteínas en los organismos pertenecientes al clado CTG.

En *D. hansenii* no hay estudios previos de su uso de codón alternativo. Aún quedan muchas dudas con respecto a la capacidad de alternancia de codones que presenta, el porcentaje de serinación o leucilación *in vivo* e *in vitro*, la caracterización de secuencias y de función de las aaRS, la regulación de este proceso y las adaptaciones fenotípicas que le podrían estar brindando. Las secuencias génicas características de los organismos que poseen alternancia en las aaRS y el tRNA_{CAG} de *D. hansenii*, están codificadas en su genoma, por lo que esta levadura debería traducir el codón CUG de forma alterna. Para poder generar una nueva aproximación al uso del codón ambiguo en *D. hansenii*, se evaluó la variación

fenotípica y de expresión génica ante diferentes condiciones de estrés. En este trabajo se analizó la viabilidad celular, la dinámica del crecimiento, los cambios fenotípicos de colonia y de la ultraestructura. Además, se detectó la expresión génica de los genes del tRNA_{CAG}, del tRNA^{Leu}, del tRNA^{Ser}, de las LeuRS y de las SerRS durante la fase logarítmica y la fase estacionaria con el fin de determinar la respuesta a diferentes rangos de estrés salino, de pH y de estrés oxidante. Este es el primer estudio sobre los niveles de transcripción del tRNA_{CAG} ambiguo y de las aaRS relacionadas con el uso del codón CUG alterno como respuesta al estrés.

3. Objetivos e Hipótesis

3.1 Objetivo general

- Determinar los cambios en la expresión de los genes implicados en la ambigüedad del codón CUG de *D. hansenii* en distintas condiciones de estrés.

3.2 Objetivos particulares

- Analizar las secuencias de los genes implicados en la ambigüedad del codón CUG en *D. hansenii* para encontrar elementos importantes para su función y su regulación.
- Establecer las condiciones de estrés en las que existan cambios fenotípicos de colonia y celulares, además de modificaciones en la velocidad de crecimiento, en *D. hansenii*.
- Conocer la expresión de cada uno de los genes implicados en la ambigüedad (LeuRScyt, LeuRSmit, SerRScyt, SerRSmit y tRNA_{CAG}) de *D. hansenii* bajo distintas condiciones de estrés.

3.3 Hipótesis

- Los genes implicados en la ambigüedad de codones de *D. hansenii* tendrán una regulación diferencial ante distintas condiciones de estrés. Estas condiciones, además, generarán cambios en la ultraestructura celular y cambios fenotípicos en las colonias de la levadura

4. Materiales y metodología

4.1 Análisis de secuencias *in silico*

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los genes de *D. hansenii* (*LeuRScyt* ID: 8998907, locus DEHA2F07414p; *LeuRSmit* ID: 2899919, locus DEHA2A05038p; *SerRScyt* ID: 2904476, locus DEHA2G01694p; *SerRSmit* ID: 2904638, locus DEHA2G04972p; *tRNA_{CAG}* ID: 8998205, locus DEHA2B07766r; *tRNA_{CGA}^{Ser}* ID: 8998944, locus DEHA2F11264r; *tRNA_{AAG}^{Leu}* ID: 8998402, locus DEHA2C16522r) fueron identificadas y utilizadas para el diseño de desoxiligonucleótidos (Allawi & Santa Lucia, 1997). El contexto genómico de los genes fue analizado con el programa ApE (A Plasmid Editor) (Davis & Jorgensen, 2022) y se realizaron alineamientos con la herramienta Clustal Omega para obtener los valores de identidad entre ellos (Madeira et al., 2022).

Se utilizó la herramienta SCPD (Zhu & Zhang, 1999) para analizar las cajas de reconocimiento de factores de transcripción. Para esto se obtuvieron las secuencias de hasta 500 pb río arriba de los genes correspondientes de *D. hansenii* y se rastrearon las cajas promotoras que más se parecen a las de *S. cerevisiae*.

Las secuencias génicas de los tRNA del clado CTG-Ser1 (*M. bicuspidata*1 ID: 30032540, locus METBIDRAFT_t152; *M. bicuspidata*2 ID: 30032539, locus METBIDRAFT_t151; *H. burtonii* ID: 30998607, locus HYPBUDRAFT_t106, *C. tropicalis* ID: D17535.1; *C. dubliniensis* ID: 8048316, locus tRNA-Ser (CAG); *C. albicans* ID: 30515292, locus tS(CAG)1; *S. tansawaensis* ID: 30986355, locus CANTADRAFT_t43; *C. parapsilosis* ID: 59387608, locus CPAR2_t_cp_Ser(CAG)_61; *B. inositovora*1 ID: 30151225, locus BABINDRAFT_t382, *B. inositovora*2 ID: 30150929, locus BABINDRAFT_t115; *C. maltosa* ID: D26074.1) fueron alineadas y se generó el árbol por máxima parsimonia utilizando la herramienta Jalview (Waterhouse et al., 2009).

La estructura secundaria de los tRNA de *D. hansenii* y *C. albicans* fue generada con tRNAscan-SE 2.0 (Chan & Lowe, 2019; Lowe & Chan, 2016) calculando la ΔG del plegamiento.

Los datos sobre el uso de codones fueron obtenidos de Sequence Manipulation Suite (SMS) (Stothard, 2000) (SMS) y la base de datos Kazusa Codon Usage Database (Nakamura et al., 2000). El análisis de las rutas metabólicas implicadas se realizó con la herramienta Blast Koala (Kanehisa et al., 2016) de la base de datos de la KEGG.

4.2 Cultivo de cepas

La cepa silvestre de *D. hansenii* Y7426 fue crecida en YPD 0.6 M NaCl (1% p/v de extracto de levadura, 2% p/v peptona, 2% p/v glucosa y 0.6 M NaCl) con 2% p/v agar. *D. hansenii* fue precultivada toda la noche (16 h) en medio basal YPD 0.6 M NaCl, pH 6.5, a 28 °C con agitación continua (180 rpm). Para los análisis de tolerancia a sal, se creció la levadura durante 96 horas en

YPD con diferentes concentraciones de cloruro de sodio (0.6, 1.2, 1.8, 2.4, y 3 M). Para los de potencial de hidrógeno se crecieron en YPD durante 80 horas y se utilizó HCl o NaOH 1 M para ajustar el pH a 3.5, 4.5, 6.5, 8.5, y 9.5 después de esterilizar. Para realizar el choque de H₂O₂, los cultivos fueron expuestos por una hora a 30 mM de H₂O₂ una vez que alcanzaran la densidad óptica deseada. Para determinar el morfotipo de colonia se realizaron diferentes diluciones por goteo en cajas con medio YPD y agar en diferentes condiciones de estrés y se registraron con un microscopio estereoscópico (Carl Zeiss Stemi DV4) a 32X después de 72 horas.

4.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las muestras fueron preparadas de acuerdo con el protocolo descrito por Wright (Wright, 2000). Las colonias la cepa silvestre de *D. hansenii* Y7426 obtenidas de los cultivos en medio YPD sólido con las diferentes condiciones de estrés fueron sumergidas en solución prefijadora (PIPES 0.2 M pH 6.8, sorbitol 0.2 M, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM, glutaraldehído al 4%) toda la noche a 4 °C. Después, las células fueron centrifugadas a 1500 x g por 5 min y la pastilla fue resuspendida con agua. Las células fueron postfijadas en permanganato de potasio al 2% por 45 min. El resto del proceso fue realizado por Nayeli Torres-Ramírez y Rosario Ortiz-Hernández en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias. Las muestras fueron contrastadas con acetato de uranilo al 1%, deshidratadas en series de etanol 25 – 100% y procesadas por incrustación de resina. Se cortaron secciones ultradelgadas de 60 nm usando el ultramicrotomo Leica Ultracut UCT, se montaron en parrilla de cobre cubiertas con formvar y contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las secciones fueron observadas en un microscopio electrónico Jeol 1010 a 80 kV. Las imágenes fueron capturadas con una cámara Hamamatsu (Hamamatsu Photonics K. K., Japón).

4.4 Curvas de crecimiento

El crecimiento celular fue monitoreado por densidad óptica a 600 nm (DO). Cada curva de crecimiento fue realizada por triplicado. Los cultivos en cada uno de los medios correspondientes fueron inoculados a 0.05 DO con células lavadas del precultivo de toda la noche de YPD con 0.6 M NaCl e incubadas por al menos 80 h tomando una muestra cada 4 horas.

4.5 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

El RNA total de las células fue extraído siguiendo un protocolo modificado de extracción para *S. cerevisiae* (Schmitt et al., 1990) de cultivos de 50 mL del medio seleccionado. Las muestras de crecimiento exponencial (1.0 DO) fueron colectadas después de 15 h de cultivo continuo en YPD 0.6 M NaCl, y choque de H₂O₂ 30 mM, 25 h en pH 3.5 y 8.5, y 48 h en 2.4 M NaCl. Las muestras de crecimiento en fase estacionaria fueron tomadas después de 56 h en YPD y 0.6 M NaCl, 48 h en pH 3.5, 8.5, choque de H₂O₂ 30 mM, y 90 h en 2.4 M NaCl.

Las células fueron recolectadas por centrifugación y resuspendidas en 600 μ L de buffer AE (acetato de sodio 50 mM, EDTA 10 mM). Las células resuspendidas fueron transferidas a un tubo de microcentrífuga de 2 mL con 450 μ L de microperlas de vidrio (425-600 μ m), 450 μ L de fenol pH 4.5, y 40 μ L de SDS al 10% y mezcladas con vórtex. La mezcla fue incubada por 5 min a 65 °C y agitada con vórtex por 30 s. La suspensión se enfrió a -70 °C por 3 min y después fue centrifugada por 5 min a máxima velocidad para separar la fase acuosa y la fase de fenol. La fase superior fue transferida a un tubo de microcentrífuga nuevo y extraída con un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1, pH 4.5, dos veces. Después, la fase acuosa fue extraída una vez más con un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1. Para precipitar el RNA de la fase acuosa se agregaron 1/10 volúmenes de acetato de sodio 0.3 M, pH 5.3, y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. La mezcla fue incubada por 60 min a -70 °C y centrifugada por 15 min a 16000 x g. El sobrenadante se descartó, la pastilla se lavó con etanol al 75% y se secó en campana. Por último, se resuspendió en 25 μ L de agua estéril libre de RNasas.

Después de la cuantificación y analizar la relación 260/280 y 260/230 en un nanoespectrofotómetro, se verificó la integridad del RNA en un gel desnaturalizante de agarosa. Posteriormente se digirieron 2 μ g de RNA total con DNasa I para remover cualquier contaminante de DNA genómico. A continuación, se realizaron reacciones de síntesis de cDNA utilizando el kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis de Thermofisher® con hexámeros aleatorios.

4.6 RT-qPCR

Se realizó la amplificación y detección del cDNA por PCR utilizando el kit SYBR FAST qPCR (KAPA BIOSYSTEMS), utilizando 1 μ L de cDNA por cada 10 μ L de reacción usando los desoxioligonucleótidos P1-P2, P3-P4, P5-P6, P7-P8, P9-P10, P11-P12, P13-P14 respectivamente (Tabla 2) y verificando su amplificación con gel de electroforesis. La cuantificación se realizó con el Rotor Gene Q (Qiagen) usando el *software* Q-Rex (Qiagen). El perfil de ciclado consistió de una desnaturalización inicial a 98 °C por 5 min y 40 ciclos de desnaturalización a 98 °C por 30 s, alineamiento a 55 °C por 30 s, amplificación y detección a 72 °C por 15 s. Para el análisis de los resultados se obtuvo el $\Delta\Delta C_q$ con \log_2 utilizando el gen *DhRPS3* como referencia, ya que su expresión es estable ante las condiciones de estrés utilizadas (Fig. 10). Cada grupo se analizó por triplicado y se utilizó YPD 0.6 M NaCl como condición estandarizada. El valor de significancia fue obtenido por ANOVA de dos vías.

4.7 Propiedades fisicoquímicas de las proteínas

Los puntos isoeléctricos de las proteínas (pI) de los proteomas de *D. hansenii*, *C. albicans* y *S. cerevisiae* se obtuvieron de la base de datos de puntos isoeléctricos (Kozlowski, 2017). El valor de pI de las proteínas de *D. hansenii* y *C. albicans* se calculó como 5.68 para la Serina y 5.98 para la

Leucina para cada codón CUG. Se compararon los perfiles proteómicos de pI y se realizó un análisis de varianza mediante ANOVA.

Asimismo, se calcularon los valores de hidropatía sumando el valor de hidropatía de cada aminoácido en cada proteína utilizando tres escalas de hidropatía diferentes (Eisenberg, Schwarz, et al., 1984; Eisenberg, Weiss, et al., 1984; Kyte & Doolittle, 1982). Se procesaron un total de 6268 genes de *D. hansenii*, 6030 de *C. albicans* y 6002 de *S. cerevisiae*. El trabajo realizado a partir de estos análisis de las propiedades fisicoquímicas continuó por parte de la alumna de licenciatura Anya Miranda Reyes Torres en su tesis de Licenciatura, bajo mi supervisión hasta su titulación.

5. Resultados

5.1 Análisis de secuencias

5.1.1 Análisis de secuencias de las aminoacil-tRNA sintetasas

Para poder determinar la posibilidad de que *D. hansenii* tenga mecanismos de ambigüedad similares a los demostrados experimentalmente en *C. albicans*, primero se realizó un análisis de las secuencias de las aaRS de *D. hansenii* con respecto a las de *C. albicans*.

D. hansenii posee dos aaRS para cargar Serina y dos para cargar Leucina, que se han denominado como SerRScyt y SerRSmit y LeuRScyt y LeuRSmit por su origen filogenético y no por su localización intracelular, siendo las “cyt” de origen eucariótico y las “mit” de origen procariótico. Las secuencias de los genes de las aaRS de *D. hansenii* y de *C. albicans* fueron comparadas con Clustal Omega (Madeira et al., 2022) para determinar si su función podría estar conservada.

Existe una identidad del 74% entre las LeuRScyt de estos dos organismos. La secuencia de *D. hansenii* no posee ningún sitio CUG mientras que la de *C. albicans* posee un sitio CUG. En *D. hansenii*, el sitio CUG homólogo está sustituido por el codón UUA que codifica para Leucina. Las SerRScyt comparten una identidad del 83%. La secuencia de *D. hansenii* tampoco posee sitios CUG mientras que la de *C. albicans* posee uno, el sitio homólogo está sustituido por un codón AGU que codifica para Serina.

Por otro lado, existe una identidad del 59% entre los genes de las LeuRSmit y del 58% entre las SerRSmit de estos dos organismos. Ni la secuencia LeuRSmit de *D. hansenii* ni la de *C. albicans* poseen sitios CUG dentro de su secuencia, sin embargo, la secuencia de SerRSmit de *D. hansenii* contiene siete sitios CUG mientras que la de *C. albicans* tiene sólo dos sitios CUG. El hecho de tener siete sitios CUG en el transcrito podría implicar una gran plasticidad fenotípica en la proteína traducida.

La LeuRScyt y la SerRScyt de *D. hansenii* son muy similares en su composición de aminoácidos a las de *C. albicans*, sobre todo en el extremo carboxilo para LeuRScyt y en el extremo amino para SerRScyt, por lo que se propone que tienen la misma función de leucilar al tRNA_{CAG}. A pesar de esto, no se ha comprobado que la LeuRSmit y la SerRSmit no puedan realizar el cargado, por lo que fueron consideradas en los análisis posteriores.

5.1.2 Análisis de elementos del promotor

Se analizaron las cajas de reconocimiento de factores de transcripción con la herramienta SCPD (Zhu & Zhang, 1999) tomando en cuenta hasta 500 pb río arriba como la región con la

posible secuencia promotora, para poder determinar si la regulación de los genes implicados en la ambigüedad podría estar determinada por factores de estrés.

La secuencia promotora hipotética de LeuRScyt de *D. hansenii* posee elementos de reconocimiento de MATalpha2, GCN4, BAS2, SWI5 y los elementos conservados TBP. La secuencia promotora hipotética de la SerRScyt de *D. hansenii* posee sólo elementos de reconocimiento tipo TBP. La secuencia promotora hipotética de la LeuRSmit de *D. hansenii* posee cajas de reconocimiento de BAS2, GCN4, MSE, ECB y HSTF. La secuencia promotora hipotética de la SerRSmit de *D. hansenii* posee elementos de reconocimiento GCN4, BAS2, AP-1 y TBP. Por último, se analizaron las cajas presentes en el promotor hipotético del tRNA_{CAG} de *D. hansenii*. Este tRNA parece tener una regulación mediada por BAS2, GCN4, GCR1, STRE, ORC Y TBP (Anexo 1).

Los diversos elementos regulatorios presentes en cada uno de los promotores de estos genes, con excepción de la caja TBP, tienen una regulación mediada por condiciones de estrés, por lo que se sugiere que los transcritos podrían estar expresándose diferencialmente con respecto a las condiciones ambientales.

5.1.3 Conservación de la secuencia y de la estructura del tRNA_{CAG} en el clado CTG-Ser1

Hasta el momento se ha estudiado la ambigüedad en la traducción del clado CTG-Ser1 solamente en *C. albicans*, por lo que se analizaron los genes de los tRNA_{CAG} de las especies del clado secuenciadas hasta el momento, como se describe en los materiales y métodos, para identificar la conservación de las características implicadas en la ambigüedad del codón CUG (Fig. 3). Este análisis más profundo de los tRNA puede ayudar a dilucidar cuáles de estos organismos tienen la capacidad de realizar la codificación ambigua del codón CUG debido al cargado ambivalente del tRNA_{CAG} por las aaRS.

La estructura del tRNA_{CAG} de *C. albicans* tiene tres propiedades inusuales: (i) una guanosina (G) en la posición 33 adyacente al anticodón CAG, (ii) la estructura GGG-CCC en el brazo T ψ C que tiene elementos de reconocimiento para las LeuRS y las SerRS, y (iii) el tRNA_{CAG} que posee una G en la posición 73 del 3' que es reconocida por SerRS para cargar Serina (Perreau et al., 1999; M. A. Santos et al., 1993; M. A. S. Santos et al., 2011).

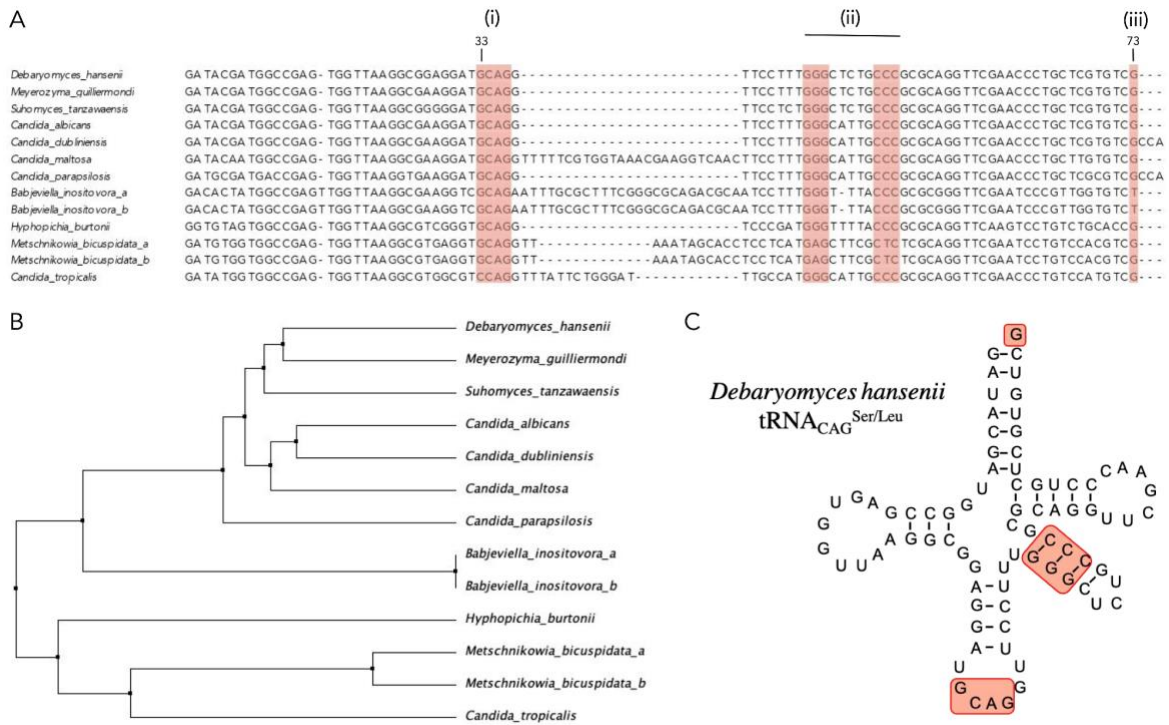


Figura 3. Análisis de la secuencia y estructura del tRNA_{CAG} del clado CTG-Ser1. A) Alineamiento múltiple de los genes tRNA_{CAG} de los genomas completamente secuenciados del clado CTG-Ser1. Sombreado en rojo se destacan las regiones de reconocimiento de LeuRS y SerRS (i, ii, iii). B) Árbol reconstruido utilizando secuencias de los genes del tRNA_{CAG} del clado CTG-Ser1. C) Estructura secundaria del tRNA_{CAG} de *D. hansenii* con los elementos de reconocimiento de LeuRS y SerRS resaltados.

Uno de los principales nucleótidos conservados en la mayoría de los tRNA es la uridina (U) en la posición 33 adyacente al anticodón; una U en esta posición genera un bucle en el anticodón que expone la región y facilita la interacción codón-anticodón (Ladner et al., 1975). Se observa que la G en la posición 33 (i) en el bucle del anticodón es compartida por todas las levaduras del clado CTG-Ser1, excepto en *Candida tropicalis* (Fig. 3 A). Esta característica distorsiona el brazo del tRNA dando lugar a una menor especificidad por el codón (Perreau et al., 1999; M. A. Santos et al., 1996). La región CCC-GGG del brazo TψC (ii) está conservada en todos los organismos del clado excepto en *Metschnikowia bicuspidata*. Por último, la G en la posición 73 (iii) está presente en todas las especies del clado CTG-Ser1, excepto en *Babjeviella inositovora*.

El árbol filogenético (Fig. 3B) muestra que *D. hansenii* se agrupa junto a *Candida* spp. y *Meyerozyma guilliermondii* y *Suhamyces tansawanensis*, por lo que se espera que este grupo mantenga la ambigüedad de codones como se ha observado experimentalmente en *C. albicans*. Otros dos grupos diferentes están formados por *B. inositovora* y los más lejanos *M. bicuspidata* y *C. tropicalis*. Todo esto indica que, aunque algunas especies no tengan la

5.2 Modificaciones en el fenotipo de colonia, ultraestructura y la tasa de crecimiento en *D. hansenii* bajo condiciones de estrés

5.2.1 Modificaciones del fenotipo de colonia por estrés

La leucilación o serinación de los codones CUG inducida por el estrés podría contribuir al mantenimiento de la capacidad de adaptación en los miembros del clado CTG-Ser1. Se ha demostrado previamente que existen diversos organismos que realizan un cargado inespecífico de aminoácidos en condiciones de estrés (Chan et al., 2012; Edelman & Gallant, 1977; Javid et al., 2014; Pang et al., 2014; Schwartz & Pan, 2016).

Dado que *D. hansenii* puede habitar en ambientes extremos de salinidad, acidez y alcalinidad, se estudió su capacidad de crecimiento, tolerancia y supervivencia en diferentes condiciones de estrés, cultivando a las células en medios ricos (YPD) con diferentes rangos de pH, NaCl y H₂O₂ como se describe en los materiales y métodos. Los morfotipos de las colonias bajo diferentes condiciones de estrés se muestran en la Fig. 5.

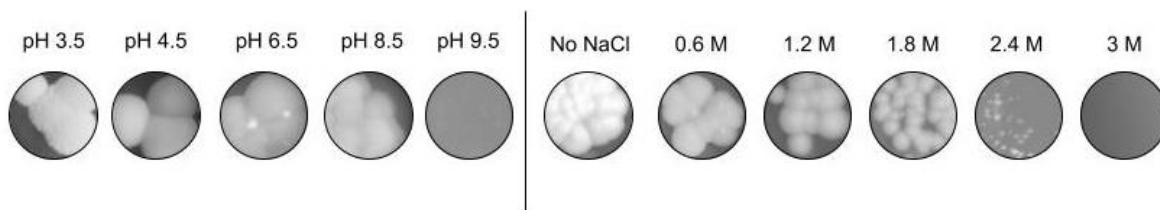


Figura 5. Morfología de la colonia de *D. hansenii* en condiciones de estrés por salinidad y pH. Morfología de las colonias tras 72 horas de crecimiento en medios sólidos con diferentes valores de pH con salinidad constante de 0.6 M de NaCl (izquierda) y diferentes concentraciones de NaCl con un pH de 6.5 constante (derecha).

Las colonias de *D. hansenii* en condiciones estándar (YPD 0,6 M NaCl, pH 6,5) son redondas, opacas y ocasionalmente brillantes, con bordes rugosos. Cuando el pH disminuye, tanto los bordes como la rugosidad de la superficie se exageran, mientras que, al aumentar el pH, las colonias se vuelven menos opacas y con bordes redondeados y un diámetro menor. Sin NaCl, las colonias son completamente opacas, mientras que el brillo aumenta y las colonias se vuelven más pequeñas con bordes más definidos a medida que aumenta la concentración de sal.

5.2.2 Curvas de crecimiento en diferentes condiciones de NaCl y pH

Además de los cambios fenotípicos, otra forma de analizar las condiciones en las que una población se encuentra en estrés ambiental es a partir de su dinámica de crecimiento. Se calculó la Tasa de Crecimiento Específico (TCE) en la fase logarítmica, y se observó que a

medida que aumenta la concentración de sal, la TCE disminuye exponencialmente. Mientras tanto, la TCE se reduce cuando el pH es ácido o alcalino. Se siguió la dinámica de crecimiento de *D. hansenii* hasta 96 h en diferentes concentraciones de NaCl y diferentes pH (Fig. 6).

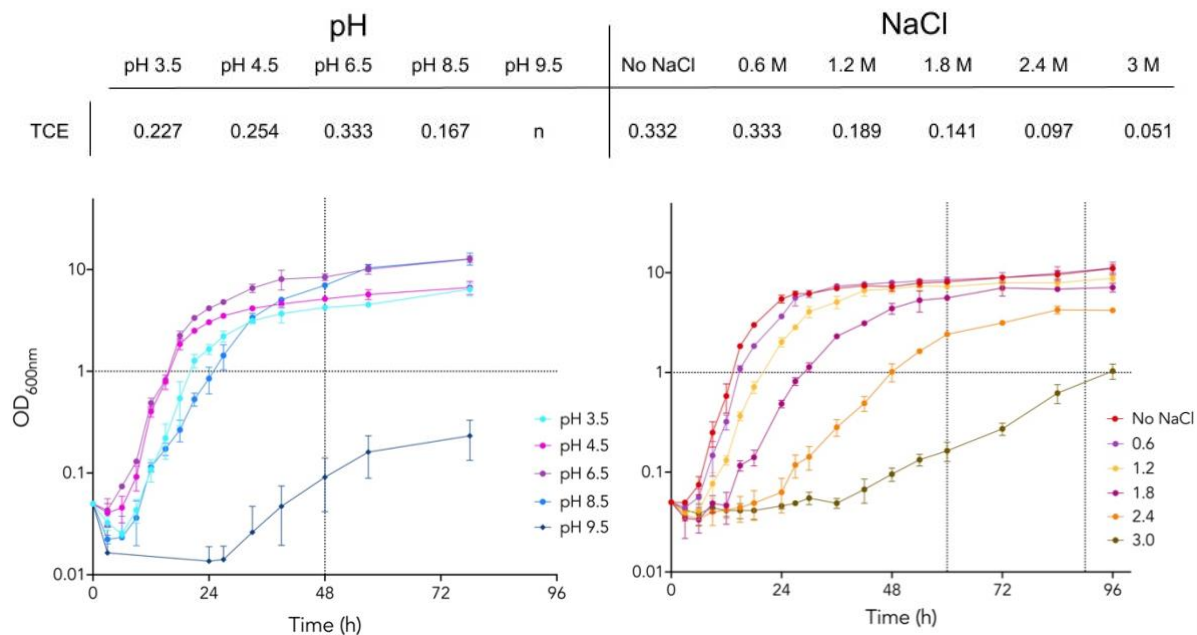


Figura 6. Velocidad de crecimiento y curvas de crecimiento de *D. hansenii* en condiciones de estrés por salinidad y pH. TCE y curvas de crecimiento en diferentes valores de pH (izquierda) y diferentes concentraciones de NaCl (derecha). Líneas punteadas: Muestreo para RNA RT-qPCR. n = sin crecimiento.

Las condiciones de estrés se definieron como aquellas que afectaban a la tasa de crecimiento, pero permitían la proliferación por encima de 1.0 DO. Por tanto, se eligieron las condiciones de estrés de pH 3.5 y pH 8.5 y de 2.4 M de NaCl, para determinar la expresión de tRNA_{CAG} y aaRS durante las fases logarítmica y estacionaria. También se seleccionó la condición sin sal ya que *D. hansenii* es eurihalina y crece de forma óptima entre 0.5 y 1 M de NaCl (Prista et al., 2016; Segal-Kischinevzky et al., 2011). Además, se evaluó una condición de estrés oxidante, un choque de 30 mM de H₂O₂ durante una hora, ya que en ésta la viabilidad del cultivo disminuye en un 50% (De la Fuente et al., en preparación).

5.2.3 Análisis de la ultraestructura celular en cultivos de *D. hansenii* bajo condiciones de estrés

Las características ultraestructurales de las levaduras cultivadas en diferentes condiciones de estrés se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión, TEM (Fig. 7), con el fin de observar modificaciones intracelulares que pudieran estar ocurriendo a la par de los cambios fenotípicos de colonia y de la dinámica de crecimiento poblacional. Las células

cultivadas en condiciones estándar (A-D) muestran mitocondrias con morfología típica, con sus crestas y las membranas externa e interna intactas (B). Se observa la vacuola con un contenido granular y también la acumulación de carbohidratos de reserva en el citosol cerca de la mitocondria (C). La pared celular y la membrana plasmática se encuentran completamente unidas (D).

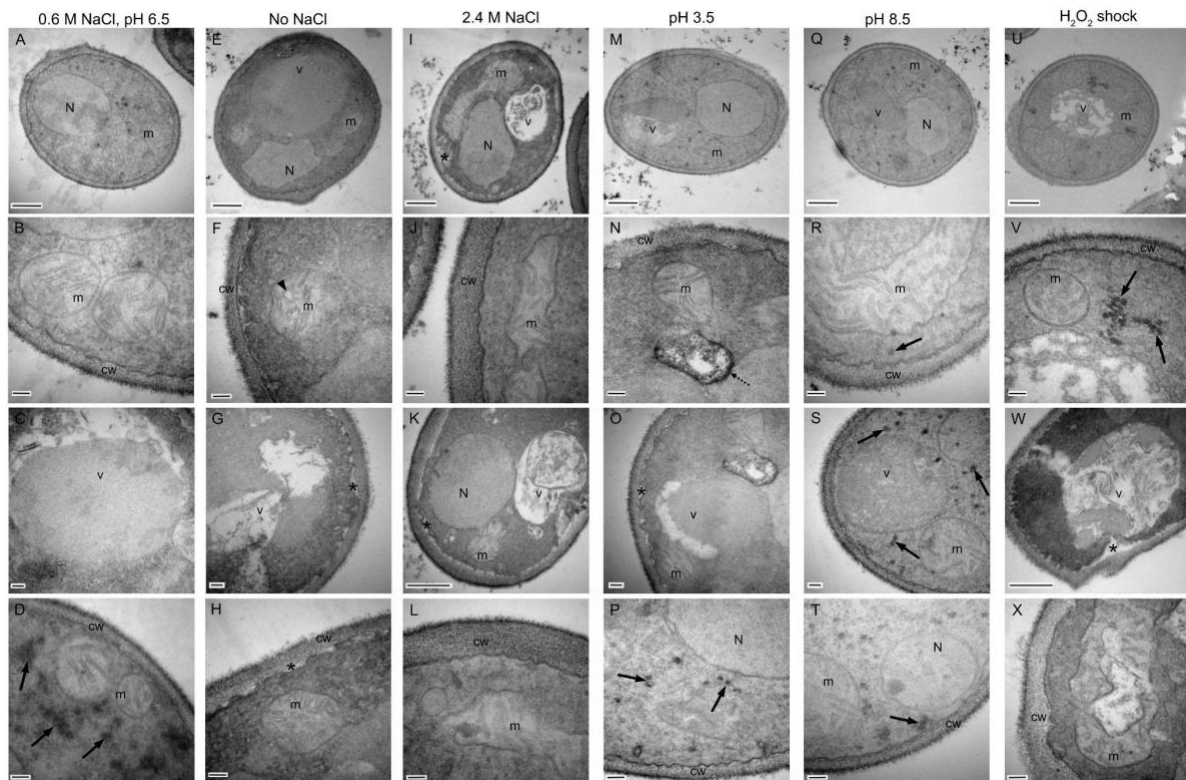


Figura 7. Cambios ultraestructurales de *D. hansenii* por TEM. Micrografías de células expuestas a condiciones estándar (A-D) sin sal, (E-H) hipersalinidad, (I-L) acidez, (M-P) alcalinidad, (Q-T) y un choque oxidante (U-X). Fila superior: vista panorámica, barra de 500 nm; segunda fila: detalle de las mitocondrias, barra de 100 nm; tercera fila: detalle de las vacuolas, barra de 100 nm (C, G, O, S) y barra de 500 nm (K, W); fila inferior: detalle de la pared celular, barra de 100 nm. N, núcleos; m, mitocondrias; v, vacuola; cw, pared celular. Flechas negras (D, P, R, S, T, V), cúmulo de carbohidratos; punta de flecha (F), cresta mitocondrial; flecha discontinua (N), zonas electrodensas; asterisco (G, H, I, K, O, W) discontinuidad de la membrana plasmática y la pared celular.

La morfología de la vacuola y de las mitocondrias se vio fuertemente afectada por los cambios en la salinidad (E-L), las variaciones del pH (M-T) y el estrés oxidante (U-X), pero, en particular, el núcleo mantuvo su integridad en todas las condiciones.

Las células cultivadas en un medio de cultivo sin NaCl (E-H) mostraron mitocondrias con una morfología alterada y crestas irregulares. Las vacuolas tienen un aspecto irregular y contenido fibrilar. Además, hay regiones con pérdida de interacciones entre la membrana y la pared celular. No se observó acumulación citosólica de carbohidratos de reserva.

En condiciones de hipersalinidad (I-L), se reconocieron mitocondrias alargadas, lo que sugiere la fusión de este orgánulo. Asimismo, se observaron regiones con pérdida de interacciones entre la membrana plasmática y la pared celular. Tampoco se observó en esta condición la acumulación citosólica de carbohidratos de reserva.

El crecimiento de *D. hansenii* en un medio ácido (M-P) también induce cambios en la morfología de las mitocondrias; la vacuola presenta un contenido granular con zonas electrónicamente densas y vacías. Se pueden distinguir regiones en las que se han perdido por completo las interacciones entre la membrana plasmática y la pared celular. A pH alcalino (Q-T), son visibles las mitocondrias alargadas con crestas extendidas y las vacuolas presentan contenido granular. Además, tanto en el pH ácido como en el alcalino, se mantuvo la presencia de grupos de carbohidratos de reserva.

La exposición a un ambiente oxidante (U-X) no generó cambios en la morfología mitocondrial, pero se pudieron observar importantes alteraciones estructurales en las crestas, que estaban mal definidas y eran irregulares con zonas vacías. En el interior de las vacuolas se observan contenidos de aspecto heterogéneo, que van desde granulares hasta fibrilares con una disposición concéntrica, en la que los bordes se extienden hasta la membrana plasmática sin un límite claro. Más aún, la separación entre la membrana plasmática y la pared celular es exacerbada y muestra grupos de carbohidratos de reserva cerca de las mitocondrias.

5.3 Expresión diferencial de los genes implicados en la ambigüedad del codón CUG de *D. hansenii*

5.3.1 Diseño de desoxioligonucleótidos y extracción de RNA

En este trabajo se estudió el crecimiento de *D. hansenii* en diversas condiciones de estrés (medio sólido/líquido con salinidad, acidez, alcalinidad o choque de H₂O₂) para identificar el cambio de morfotipo como indicador de la inducción de la ambigüedad de la traducción.

Se evaluó la expresión génica diferencial de los genes tRNA_{CAG} y las LeuRS y las SerRS con el fin de observar si existe una regulación específica de ellos que esté mediada por las condiciones de estrés. Esto para determinar si existe una relación significativa entre la expresión de los genes implicados en la ambigüedad de codones y los procesos de adaptación que podrían generar ante las condiciones ambientales adversas. Para esto, primero se analizó la presencia de los tRNA en *D. hansenii* para elegir aquellos que podrían ser evaluados y utilizados como controles. Después se diseñaron desoxioligonucleótidos que permitirían amplificar las secuencias génicas por RT-qPCR y así poder cuantificar la expresión de los mismos.

D. hansenii codifica un tRNA_{CAG}, dos SerRS (SerRScyt y SerRSmit) y dos LeuRS (LeuRScyt y LeuRSmit). *D. hansenii* posee cuatro genes de tRNA^{Ser} y tres genes de tRNA^{Leu} además del tRNA_{CAG} que es ambiguo. De los genes de tRNA^{Ser} existen 4 copias del gen del tRNA para el codón AGC y para el codón TCA, una copia para el TCG y 6 copias para el codón TCT. De los genes de tRNA^{Leu} existen dos copias del gen para el codón CTT, tres copias para el codón TTG y 9 para el codón TTA. Para el análisis de expresión se seleccionaron los dos tRNA con el menor número de copias en el genoma y con la menor frecuencia de uso para comparar su expresión con el tRNA_{CAG} (tRNA^{Leu} para el codón CTT y el tRNA^{Ser} para el codón TCG) (Tabla 1).

Tabla 1. Número de copias de los genes de los tRNA para Serina y para Leucina en *D. hansenii*.

tRNA-Anticodón	Codón	Presencia	tRNA-Anticodón	Codón	Presencia
Ser-ACT	AGT	0	Leu/Ser-CAG	CTG	1
Ser-GCT	AGC	4	Leu-TAG	CTA	0
Ser-GGA	TCC	0	Leu-GAG	CTC	0
Ser-CGA	TCG	1	Leu-AAG	CTT	2
Ser-TGA	TCA	4	Leu-CAA	TTG	3
Ser-AGA	TCT	6	Leu-TAA	TTA	9

Se diseñaron desoxioligonucleótidos para amplificar entre 180 y 190 pb de la secuencia génica de las SerRS y las LeuRS y para amplificar el total de 82 pb correspondientes al tRNA_{CAG} y los tRNA^{Ser} y tRNA^{Leu} de *D. hansenii* (Tabla 2).

Tabla 2. Desoxioligonucleótidos diseñados para el RT-qPCR.

Amplicón	Tm° (Sentido- Antisentido)	Tamaño del amplicón	Secuencia de los desoxioligonucleótidos
LeuRScyt	61°- 61°	183 pb	Fwd: TGCTACGAAGTCCAAGGCTG Rev: CTCCAGTCAACTCTACCACCG

SerRScyt	61° - 62°	182 pb	Fwd: TGAACAAGAGCAAAAGGCCG Rev: ATTTGGCTTCAGCACCAGTAC
LeuRSmit	61° - 61°	189 pb	Fwd: TATGGTGGATGAACTGGCCG Rev: GCATTTTCCGCTGGTAACCC
SerRSmit	62° - 61°	184 pb	Fwd: TCTCTGGGTCCTCGTGGTAC Rev: TGTTGTTCTCCGTTTTGGTCG
tRNA _{CAG}	60° - 62°	82 pb	Fwd: GATACGATGGCCGAGTGG Rev: CGACACGAGCAGGGTTCG
tRNA ^{Ser}	62° - 64°	82 pb	Fwd: GACAATGTGGCCGAGTGGT Rev: CGACAACAGCAGGATTCGA
tRNA ^{Leu}	63° - 64°	82 pb	Fwd: CTCTGGCCGAGTTGGTCTAA Rev: AGATTCGAACTCGCGCCT

Se probó la eficiencia de amplificación de los diferentes desoxioligonucleótidos en diferentes temperaturas utilizando como molde DNA genómico (gDNA) extraído de *D. hansenii* en condiciones fisiológicas tras 24 hrs de crecimiento.

Se observó que las regiones intragénicas de los genes de LeuRScyt, LeuRSmit, SerRScyt, SerRSmit y las secuencias de los tRNA son amplificadas con los desoxioligonucleótidos correspondientes a una temperatura de alineamiento de 50 °C. Con estas temperaturas se realizaron las amplificaciones para el RT-qPCR.

De acuerdo con las gráficas de salinidad y pH se obtuvo el RNA de las condiciones elegidas tanto en fase logarítmica como en fase estacionaria de crecimiento. Además, se seleccionó la condición de choque de peróxido a 30 mM por una hora debido a que esta condición se ha analizado previamente en el laboratorio como una condición de estrés para *D. hansenii*.

Para observar la calidad de los RNA obtenidos se utilizó el nanoespectrofotómetro para evaluar las relaciones de absorbancia correspondientes. Los valores de 230/260 y de 260/280 para cada uno de los RNA osciló entre 2 y 2.2, por lo que se pudo concluir que se tenía una buena purificación. De manera adicional, las muestras se analizaron por

electroforesis en geles desnaturizantes de agarosa para observar la integridad del RNA (Fig. 8).

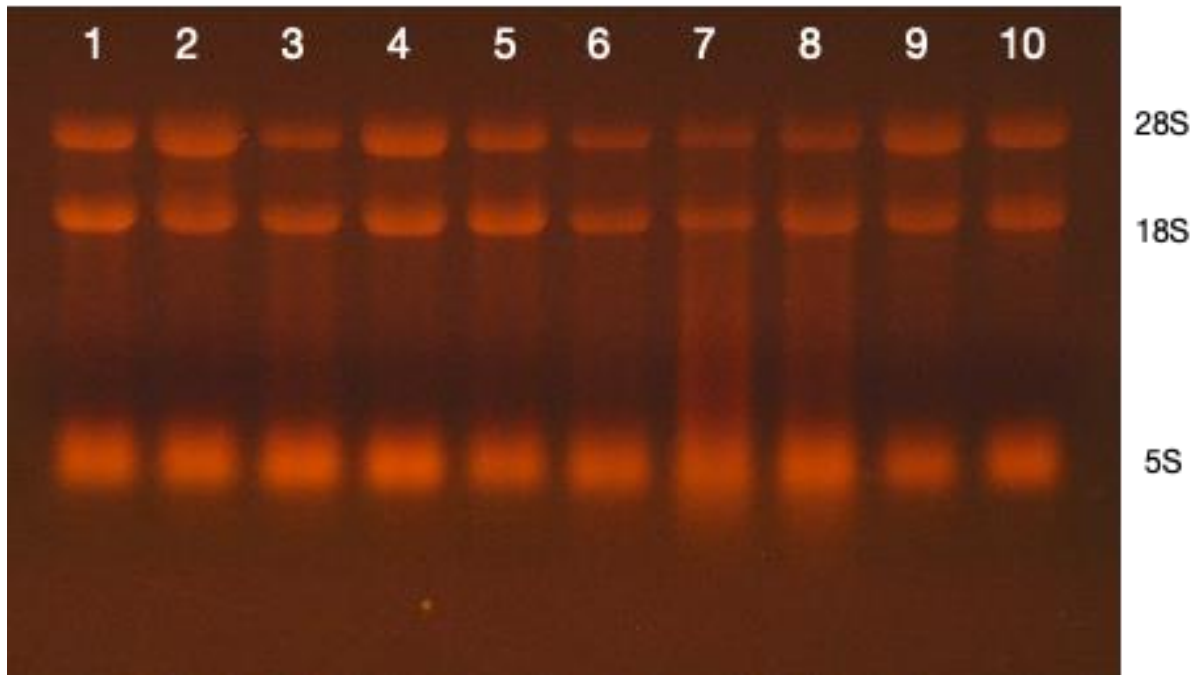


Figura 8. Electroforesis en gel desnaturizante con las muestras de la extracción de RNA total de *D. hansenii* en YPD con diferentes concentraciones de NaCl y valores de pH. 1) NaCl 0 M (log), 2) NaCl 0 M (est), 3) NaCl 0.6 M (log), 4) NaCl 0.6 M (est), 5) NaCl 2.4 M (log), 6) NaCl 2.4 M (est), 7) pH 3.5 (log), 8) pH 3.5 (est), 9) pH 8.5 (log), 10) pH 8.5 (est).

5.3.2 RT-qPCR del gen de referencia para estandarización

Una vez confirmada la integridad de las muestras de RNA de *D. hansenii* obtenidas bajo diferentes condiciones de estrés, se realizó el análisis de expresión relativa utilizando el gen *DhRPS3* de la proteína ribosomal S3 (DEHA2G22770p) de *D. hansenii* como gen de referencia. Primero se generó una curva estándar con diferentes concentraciones de DNA para poder obtener una recta patrón de los valores aproximados de amplificación de las muestras (Fig. 9).

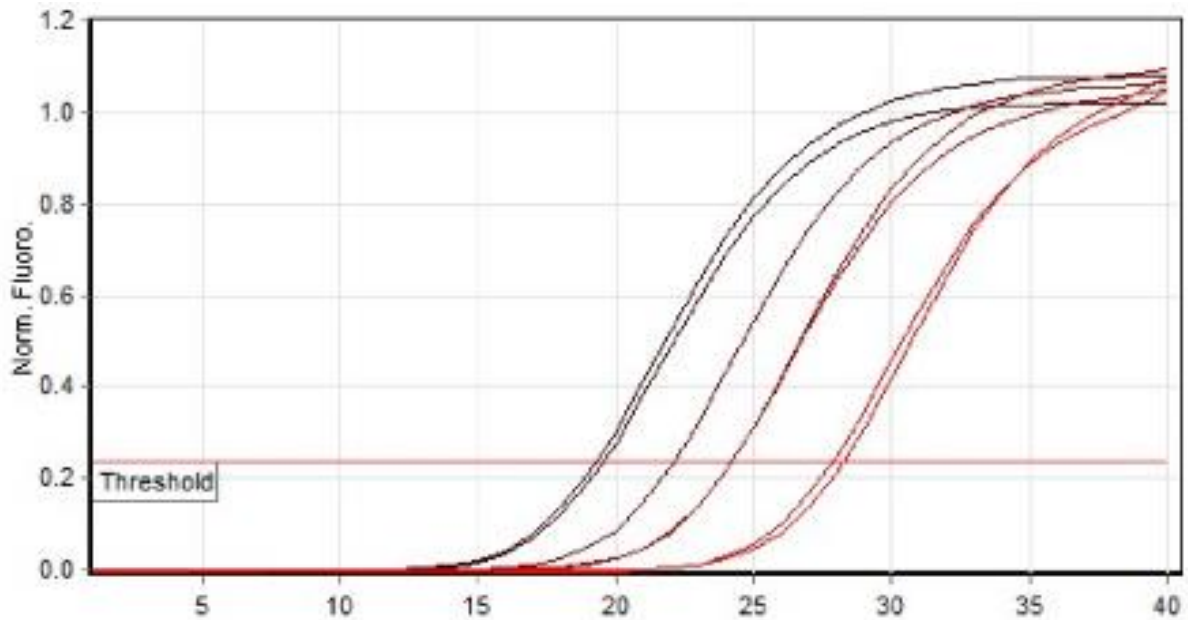


Figura 9. Expresión relativa del gen que codifica para la proteína *DhRPS3* ribosomal. Curvas de expresión utilizando DNA genómico a diferentes concentraciones como molde. Se realizaron dos repeticiones técnicas para cada concentración.

Se puede observar un incremento progresivo en el valor de Cq de acuerdo con la cantidad de DNA molde de la muestra desde el ciclo 19.5 hasta el ciclo 28.1, lo cual indica que hay amplificación en esas concentraciones de DNA molde y que se puede realizar una cuantificación dentro de estos valores de Cq.

Para poder asegurar que *DhRPS3* pudiera funcionar como gen de referencia para las condiciones elegidas, se realizó un RT-qPCR de este gen para cada una de las condiciones: las diferentes concentraciones de NaCl, los diferentes pH y la condición de choque con peróxido (Fig. 10).

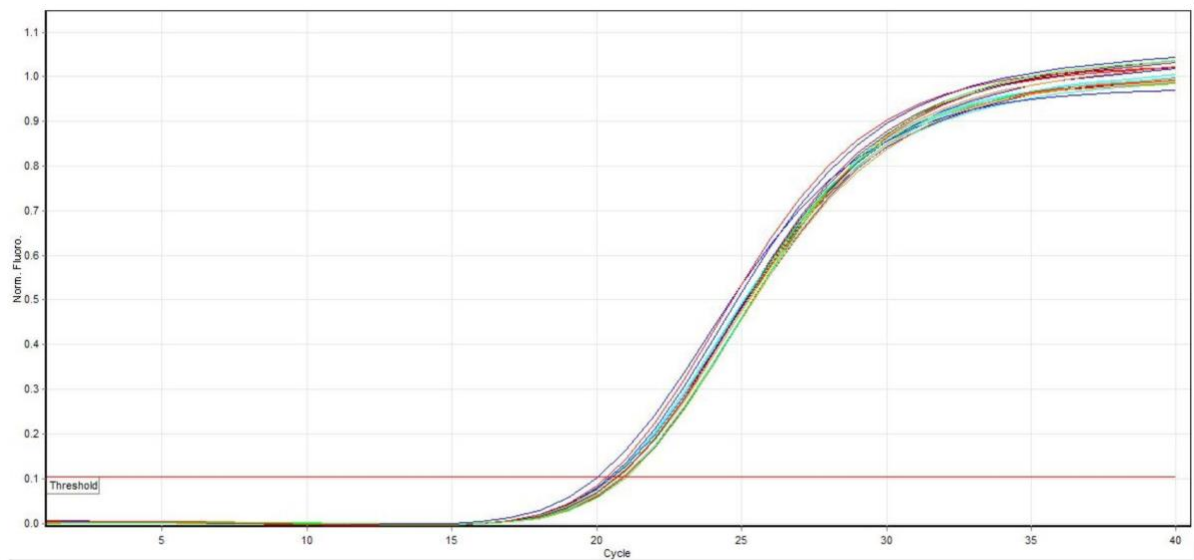


Figura 10. Gráfico de amplificación que muestra las curvas de *DhRPS3* en diferentes condiciones probadas. Umbral del ciclo del gen *DhRPS3* (Cq) en YPD (azul), 0.6 M NaCl (turquesa), 2.4 M NaCl (verde), pH 3.5 (rosa), pH 8.5 (rojo) y 30 mM H₂O₂ (amarillo).

La cuantificación de todas las condiciones es muy similar y oscila entre los 20.9 y 22.3 de Cq. Esto indica que el gen de la proteína ribosomal S3 se puede utilizar para normalizar la expresión de los demás genes dentro de las condiciones seleccionadas.

5.3.3 RT-qPCR de los genes implicados en la ambigüedad del codón CUG de *D. hansenii*

Se evaluó la expresión relativa por RT-qPCR de los genes antes mencionados tanto en fase logarítmica como en fase estacionaria con respecto a la condición control de YPD con 0.6 M de sal y pH 6.5 (Fig. 11).

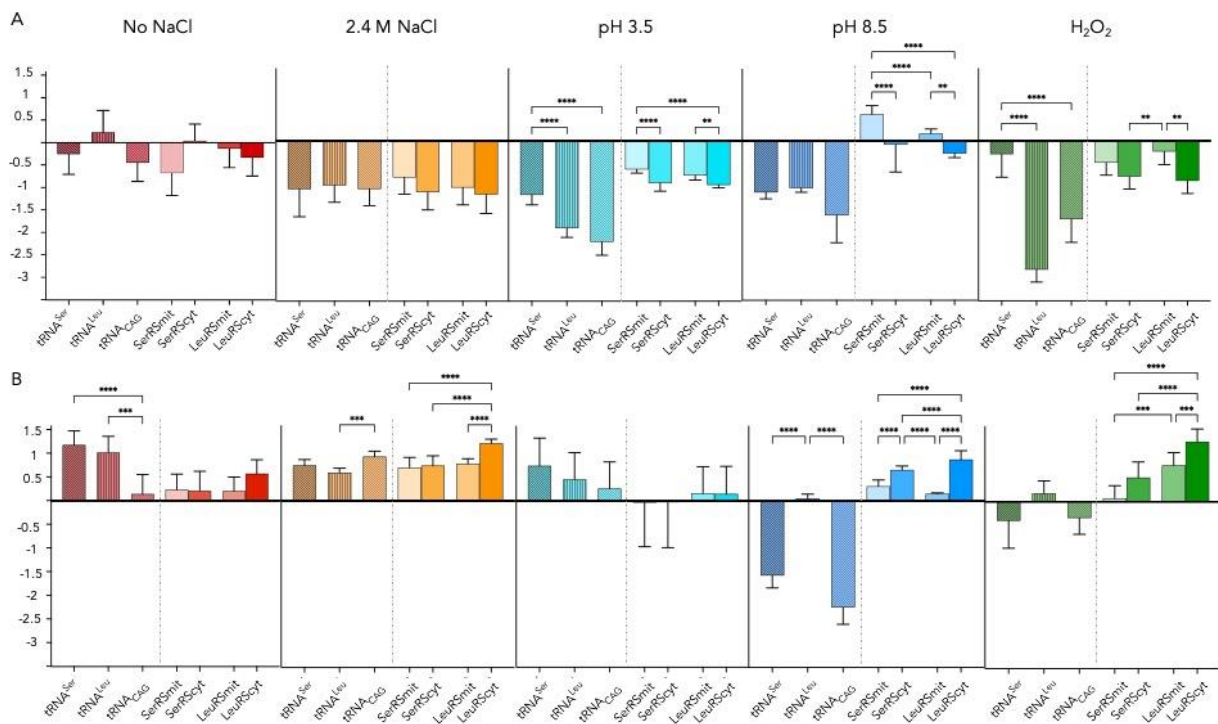


Figura 11. Análisis mediante RT-qPCR de los genes relacionados con la traducción ambigua de *D. hansenii* bajo diferentes condiciones de estrés. Se realizó una RT-qPCR sobre el cDNA utilizando desoxiligonucleótidos específicos para los genes tRNA^{Ser}, tRNA^{Leu}, tRNA^{CAG} y diferentes aaRS de *D. hansenii*. Las células se cultivaron en condiciones de salinidad, acidez, alcalinidad y choque de H₂O₂ durante las fases de crecimiento logarítmico (arriba) y estacionario (abajo). El cambio de expresión (log₂) se muestra en el eje Y y los diferentes genes en el eje X.

Durante la fase logarítmica de crecimiento, el tRNA^{CAG} está subexpresado en todas las condiciones en comparación con el control. La menor expresión se produce en la acidez, siendo 2.5 veces menor que en la condición estándar. En la fase estacionaria de crecimiento, las diferencias se producen en 2.4 M de NaCl, cuando la expresión aumenta una vez, y en alcalinidad, cuando la expresión es también menor, con casi 2.5 veces menos expresión.

Los dos pares de genes que codifican para las proteínas de leucilación y de serinación del tRNA (LeuRScyt y LeuRSmit, y SerRScyt y SerRSmit) mostraron una expresión diferencial. Durante la fase de crecimiento logarítmico, ambos LeuRS están regulados a la baja en 2.4 M de NaCl y pH 3.5, pero sólo LeuRScyt está subexpresado de manera significativa en alcalinidad. En la fase estacionaria de crecimiento, la expresión de ambos LeuRS aumentó en 2.4 M de NaCl y en el choque de H₂O₂ siendo siempre mayor la expresión de LeuRScyt que de LeuRSmit. En el caso del pH 8.5, sólo LeuRScyt se sobreexpresó.

Ambos SerRS fueron regulados a la baja durante la fase de crecimiento logarítmico en medio con 2.4 M de NaCl, pH 3.5 y choque oxidante. Se observó una expresión diferencial de los genes que codifican para las SerRS en el sentido de que sólo SerRSmit está regulado a la baja sin NaCl y al alza en la alcalinidad. En la fase estacionaria de crecimiento, la expresión

de las SerRS en la condición de 2.4 M de NaCl fue mayor que en la condición control. En pH 8.5, SerRScyt se sobreexpresó más que SerRSmit, mientras que, en el choque oxidante, SerRScyt se sobreexpresó y la expresión de SerRSmit se mantuvo sin cambios.

Posteriormente, se realizó un análisis de expresión génica integral para identificar cambios en la probabilidad de leucilación o serinación del tRNA_{CAG}, en correspondencia al balance de concentración de las siete moléculas implicadas en este proceso.

En primer lugar, comparamos los niveles de expresión de los tRNA, que son equivalentes a su concentración en la célula, ya que no son posteriormente traducidas a otra molécula. Durante la fase de crecimiento logarítmico, en pH 3.5, el tRNA_{CAG} y el tRNA^{Leu} están regulados a la baja en comparación con el tRNA^{Ser}. En el choque de H₂O₂, la expresión es dos veces menor para el tRNA_{CAG} y casi tres veces menor para el tRNA^{Leu} en comparación con la expresión basal. En la fase estacionaria de crecimiento, el tRNA^{Ser} y el tRNA^{Leu} se sobreexpresaron sin NaCl, mientras que la expresión del tRNA_{CAG} se mantuvo estable. Con 2.4 M de NaCl, el tRNA_{CAG} mostró un pequeño aumento, en contraste con el tRNA^{Leu} y el tRNA^{Ser}. La diferencia de expresión más evidente entre los tRNA se observó en la alcalinidad, donde el tRNA^{Ser} y el tRNA_{CAG} se expresaron dos y casi tres veces menos que el tRNA^{Leu}, respectivamente.

A continuación, se comparó la expresión de los aaRS asumiendo que sería proporcional a la concentración final de proteína en la célula. El gen de SerRSmit se sobreexpresó en pH 8.5, mientras que los otros tres genes de las aaRS se expresaron a niveles similares a la condición de referencia durante la fase de crecimiento logarítmico. Por otro lado, en la fase de crecimiento estacionario, LeuRScyt se sobreexpresó sin NaCl, 2.4 M de NaCl, pH 8.5 y choque de H₂O₂ al menos una vez en comparación con los otros genes aaRS.

A pesar de que encontramos diferencias de expresión individuales, hubo una tendencia general de regulación a la baja durante la fase de crecimiento logarítmico, en contraste con la regulación al alza observada en la fase estacionaria. Esto sugiere que la proporción de leucilación o serinación en el proteoma de *D. hansenii* podría reajustarse cuando se añade otro factor de estrés, como el agotamiento de nutrientes, incluyendo la disponibilidad de Leucina y de Serina.

5.4 Análisis proteómico y de vías metabólicas implicadas en la ambigüedad de codones

La traducción ambigua puede afectar a 4110 genes de *D. hansenii*, ya que casi el 66% de sus 6272 genes anotados tienen al menos un codón CUG (Fig. 12). Es por eso que se realizó un

análisis bioinformático de los genes que podrían estar siendo afectados en menor o mayor proporción por la traducción ambigua.

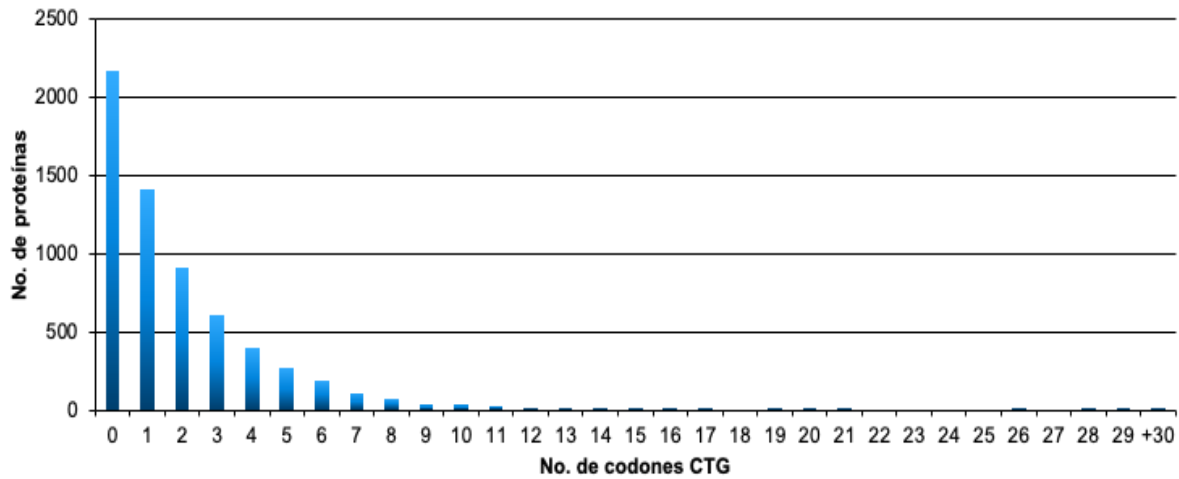


Figura 12. Distribución de los codones CUG en los genes de *D. hansenii*. El número de genes con codones CUG desciende a medida que aumenta el número de codones. 31 es el número de codones que más tiene un solo gen.

La mayor cantidad de genes con codones CTG de *D. hansenii* (1411) tienen sólo un codón CUG en su secuencia, mientras que 31 codones CUG es el número máximo encontrado para un gen. En cada codón CUG, puede haber dos posibles isoformas para codificar a una proteína, ya que podría ser cargado con Serina o con Leucina, posiblemente aumentando así la plasticidad fenotípica.

Existen dos hipótesis sobre el número de moléculas proteicas que pueden producirse a partir de los genes de *D. hansenii* considerando la carga de Serina o Leucina en cada una de estas posiciones CUG: $2n$ o $2(n)$, donde n es el número de CUG que contiene un gen (Rocha et al., 2011; Santos et al., 2011). La primera hipótesis considera una carga aleatoria no regulada del codón CUG, por lo que el genoma de *D. hansenii* tendría la capacidad de sintetizar más de 3.1×10^9 proteínas diferentes. La otra hipótesis contempla un cargado del codón CUG más restringido y regulado utilizando sólo Serina o sólo Leucina para cada proteína traducida, resultando en la síntesis de hasta 10382 polipéptidos diferentes.

Para determinar cuáles rutas metabólicas serían más afectadas por la ambigüedad del codón CUG, se realizó un análisis proteómico de las vías metabólicas de *D. hansenii* a partir del número de codones CTG que contienen los genes anotados en el genoma de esta levadura en su secuencia de DNA. El análisis se realizó con dos herramientas bioinformáticas, una que permite encontrar el número de codones en una secuencia génica (Nakamura et al.,

2000) y otra que permite la anotación de genomas y metagenomas por ortología funcional comparada con la base de datos del KEGG (Kanehisa et al., 2016).

De los resultados obtenidos con estas herramientas se pudo realizar una asociación de los genes de *D. hansenii* a partir de las vías metabólicas en las que están implicados y el número de codones CTG que contienen en su secuencia (Fig. 13).

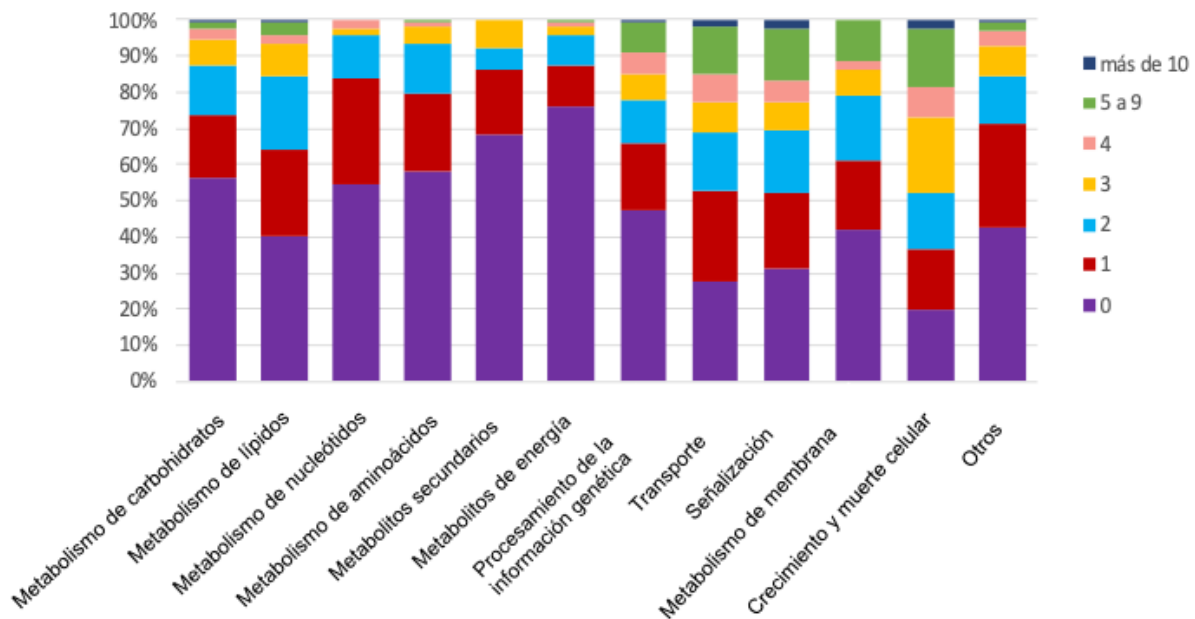


Figura 13. Uso de codones CTG en *D. hansenii*. Distribución de los codones CTG en las principales vías metabólicas de *D. hansenii* agrupadas por 0, 1, 2, 3, 4, 5-9 y más de 10 codones.

Los codones CTG de *D. hansenii* se encuentran distribuidos más en genes implicados en ciertas vías que en otras. La más notoria es en el metabolismo energético, donde los codones CTG no se presentan en más del 70% de los genes asociados con esta vía. Los genes asociados con el metabolismo de carbohidratos, de nucleótidos, de aminoácidos y de metabolitos secundarios tienen menos del 50% de sus genes con codones CTG. Los genes asociados al metabolismo de lípidos, transporte celular, señalización, membranas celulares, y crecimiento y muerte celular son los que tienen la mayor presencia de codones CTG.

Sólo unos cuantos genes implicados en transporte, señalización, y crecimiento y muerte celular poseen más de 10 codones CTG. Ningún gen implicado en vías metabólicas de nucleótidos, de aminoácidos, de metabolitos secundarios ni de energía poseen ni siquiera más de 5 codones CTG en *D. hansenii*. Los genes de procesamiento de la información genética tienen un poco más del 50% de presencia de codones CTG.

Este mismo análisis se realizó en diferentes levaduras y en diferentes codones para poder realizar una comparación proteómica de distribución de codones. Se obtuvieron los proteomas completos de *C. albicans* y *S. cerevisiae* de la base de datos de NCBI. *C. albicans* y *D. hansenii* pertenecen al clado CTG, mientras que *S. cerevisiae* pertenece al clado WGD,

en el que no se utiliza la alternancia de codones. *C. albicans* presenta un patrón similar al que se observó en *D. hansenii*, donde la vía metabólica que menos genes con codones CTG presenta es la del metabolismo de energía (Fig. 14).

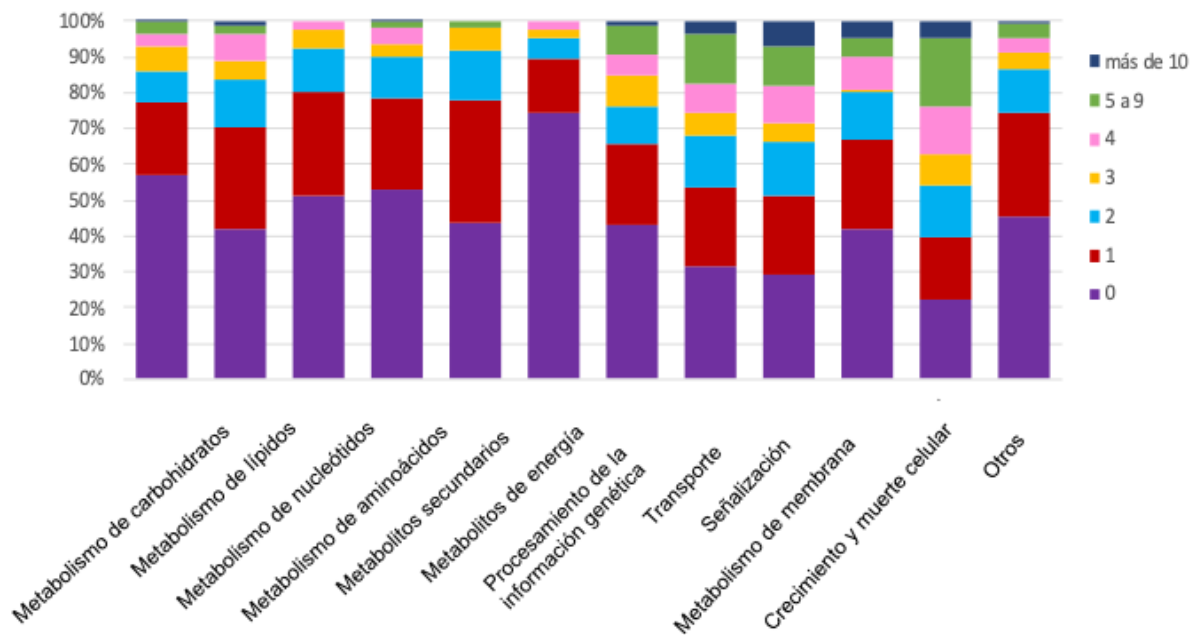


Figura 14. Uso de codones CTG en *C. albicans*. Distribución de los codones CTG en las principales vías metabólicas de *C. albicans* agrupadas por 0, 1, 2, 3, 4, 5-9 y más de 10 codones.

Los genes asociados al metabolismo de carbohidratos, de nucleótidos y de aminoácidos tienen menos del 50% de sus genes con codones CTG, mientras que los genes asociados al metabolismo secundario sin ningún codón CTG son menos del 50%. Los genes asociados al metabolismo de lípidos, transporte celular, señalización, membranas celulares y crecimiento y muerte celular son los que tienen mayor presencia de codones CTG. Al igual que en *D. hansenii*, sólo algunos de los genes implicados en transporte, señalización y crecimiento celular y muerte poseen más de 10 codones CTG por gen, pero, en este caso, el metabolismo de membrana tiene asociados un porcentaje importante de genes con más de 10 codones CTG. Ningún gen implicado en metabolismo de nucleótidos ni de energía poseen ni siquiera más de 5 codones CTG.

A continuación, se muestra la distribución de los genes con codones CTG en las diferentes vías metabólicas de *S. cerevisiae* (Fig. 15).

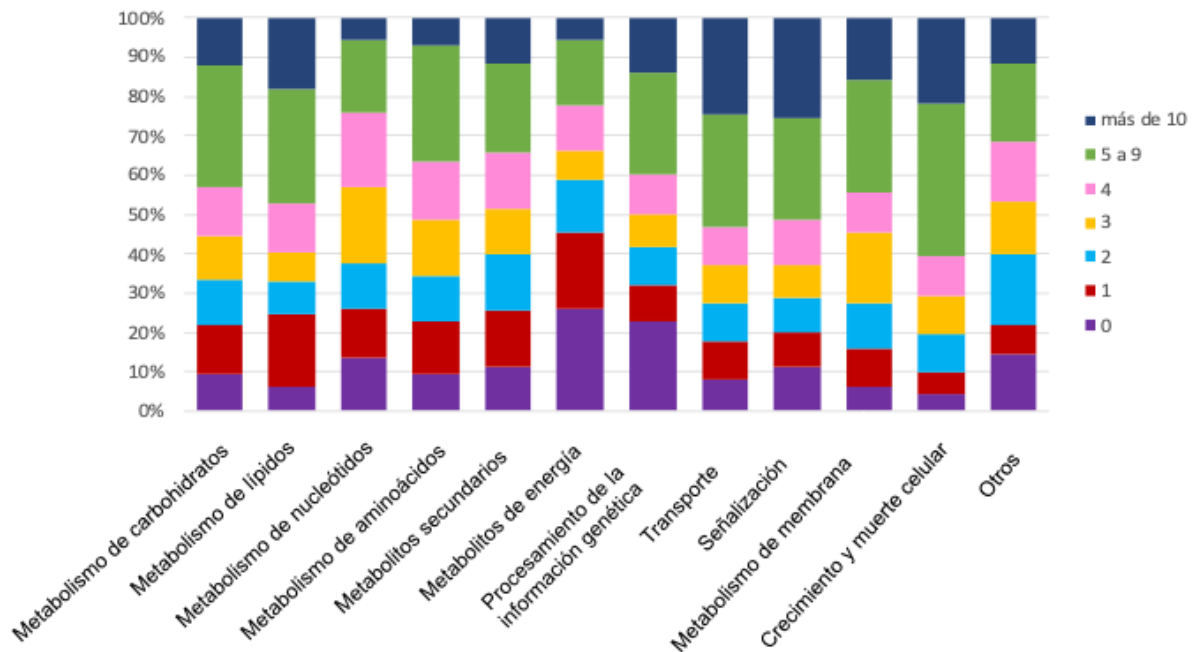


Figura 15. Uso de codones CTG en *S. cerevisiae*. Distribución de los codones CTG en las principales vías metabólicas de *S. cerevisiae* agrupadas por 0, 1, 2, 3, 4, 5-9 y más de 10 codones.

En este organismo, los genes sin codones CTG no superan el 15% en ninguna de las vías más que en la del metabolismo de energía y en la del procesamiento de la información genética. El metabolismo de lípidos, de transporte celular, de señalización, de membrana y de crecimiento y muerte celular, tienen una distribución de los genes con codones CTG menor al 7%. Algo importante a resaltar es que hay presencia de genes con más de 10 codones CTG en todas las vías metabólicas, siendo en algunos casos, como en la del metabolismo de transporte y de señalización, los que más se presentan con más del 25%. Para comprobar que esta distribución de codones en los genes de diferentes vías era específica del codón CTG, se probaron los dos codones con menor frecuencia en el genoma de *D. hansenii* que codifican para Ser y Leu. Los codones elegidos fueron TCG, que codifica para Ser (Fig. 16) y CTT, que codifica para Leu (Fig. 17).

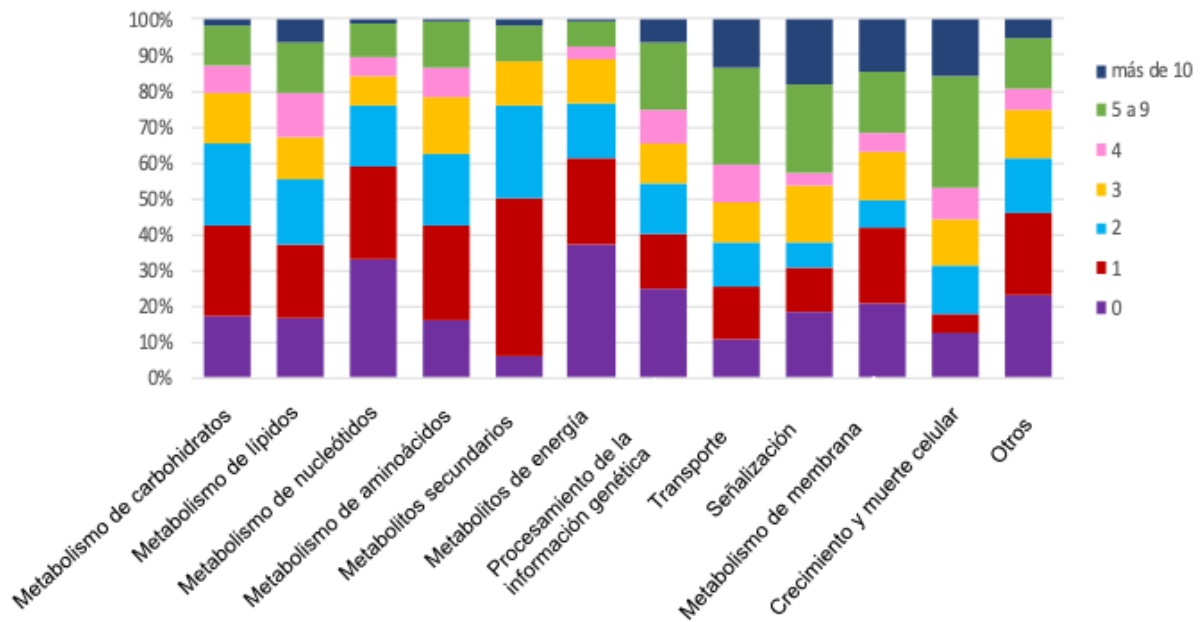


Figura 16. Uso de codones TCG en *D. hansenii*. Distribución de los codones TCG en las principales vías metabólicas de *D. hansenii* agrupadas por 0, 1, 2, 3, 4, 5-9 y más de 10 codones.

Los genes con codones TCG se encuentran distribuidos de forma muy distinta a los genes con codones CTG en las vías metabólicas de *D. hansenii*. No hay codones TCG en menos del 20% de todas las vías excepto en el metabolismo de nucleótidos, metabolismo energético y procesamiento de información genética, muy similar a lo que sucedía con el codón CTG de *S. cerevisiae*. La vía con menos genes sin codones TCG es la de metabolitos secundarios, siendo también la vía metabólica con mayor número de genes con un codón TCG. Existen, también, ciertas vías en las que hay una muy baja presencia de genes con más de 10 codones TCG como el metabolismo de carbohidratos, de nucleótidos, de aminoácidos, de metabolitos secundarios, y de energía. Para el codón TCG la mayor presencia de genes con más de 10 codones está en los metabolismos de transporte, señalización, membrana y crecimiento y muerte celular.

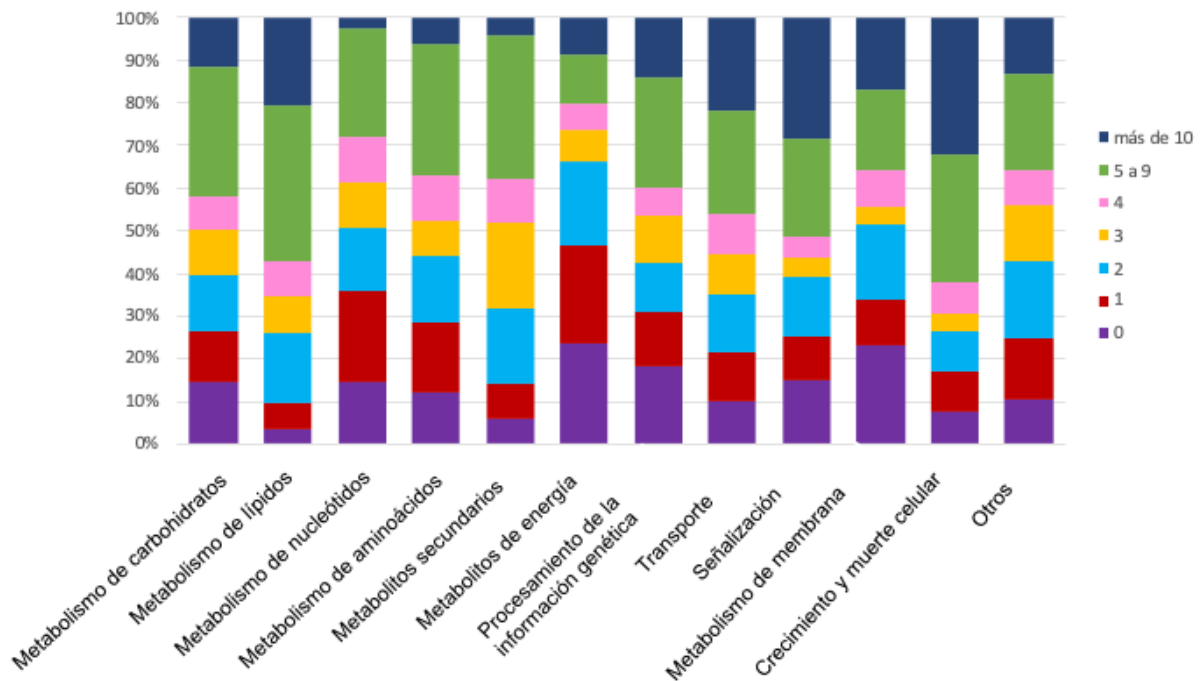


Figura 17. Uso de codones CTT en *D. hansenii*. Distribución de los codones CTT en las principales vías metabólicas de *D. hansenii* agrupadas por 0, 1, 2, 3, 4, 5-9 y más de 10 codones.

Hay muy pocos genes sin codones CTT en las diferentes vías metabólicas. Los genes del metabolismo de lípidos y de metabolitos secundarios son los que tienen más codones CTT, con más del 95%. Ninguna de las vías supera el 25% de genes sin codones CTT; el metabolismo de membrana y de metabolitos secundarios son los únicos que superan el 20%. Además, hay una mayor presencia de genes con más de 5 codones CTT en todas las vías, superando incluso el 50% de los genes en el metabolismo de señalización. Los genes con más de 10 codones se encuentran principalmente asociados a transporte, señalización, y crecimiento y muerte celular, además de que el metabolismo de lípidos posee la mayor cantidad de genes con más de 10 codones. En estas vías metabólicas más del 20% de los genes tienen más de 10 codones CTT.

6. Discusión

A pesar de que el código genético fue considerado como universal e inmutable, se han descrito múltiples excepciones a su universalidad. Recientemente, se ha propuesto que la decodificación ambigua de varios codones puede mejorar la adaptación de los organismos a las condiciones de estrés promoviendo la diversidad de proteínas y, por lo tanto, la plasticidad fenotípica (Hoffman et al., 2017; Lant et al., 2019; Mohler & Ibba, 2017; Reynolds et al., 2010).

El clado CTG-Ser1 es un grupo de levaduras no convencionales con ambigüedad en el codón CUG (Kawaguchi et al., 1989; Krassowski et al., 2018; Suzuki et al., 1997). En este trabajo, el análisis de la secuencia de los genes tRNA_{CAG} mostró que no todos los miembros del clado conservan los elementos para traducir ambiguamente o pueden ser reconocidos por LeuRS y SerRS. *Candida tropicalis*, *Metschnikowia bicuspidata* y *Babjeviella inositovora* podrían estar traduciendo el codón CUG como Serina, pero no necesariamente también como Leucina, debido a que no poseen los sitios de doble reconocimiento.

D. hansenii, sin embargo, es una de las especies pertenecientes a este clado que posee un 96% de identidad de su tRNA_{CAG} con el de *C. albicans*, que ha sido demostrado experimentalmente como un tRNA que puede ser cargado con los dos aminoácidos. El tRNA_{CAG} de *D. hansenii* conserva tanto la estructura secundaria como las características de la secuencia que permiten su reconocimiento por las dos aaRS diferentes.

Además, las aaRS de *D. hansenii* poseen valores altos de identidad con respecto a las aaRS citoplasmáticas de *C. albicans* y sobre todo un alto grado de conservación de las regiones predichas para el cargado del tRNA con el aminoácido correspondiente. Todo esto apoya la idea de que el proceso de cargado ambiguo en *D. hansenii* y en *C. albicans* ocurre de forma similar en los dos organismos.

El análisis de los elementos regulatorios presentes en el promotor hipotético de los genes implicados en la ambigüedad de *D. hansenii* sugiere un comportamiento regulatorio muy interesante. Los elementos MAT α 2 se utilizan para regular genes de apareamiento y tipo sexual. Los elementos GCN4 son responsables de la activación de genes requeridos para la síntesis de aminoácidos y purinas en inanición. Los elementos BAS2 regulan genes de metabolismo de fosfato en respuesta a hipoxia. Los elementos SWI5 se utilizan para la expresión de HO⁽⁻⁾ que controla la compatibilidad sexual y reproductiva. Finalmente, los elementos TBP son las cajas TATA, que son regiones muy conservadas y necesarias para la transcripción de muchos genes en prácticamente todos los organismos conocidos.

LeuRScyt, SerRSmit, LeuRSmit y el tRNA_{CAG} parecieran estar regulados por muchos elementos regulatorios que están implicados en la división celular y en situaciones de estrés como la inanición e hipoxia. Sin embargo, la SerRScyt pareciera no estar regulada en lo absoluto, ya que posee solamente las cajas TATA para su expresión. Es importante recalcar

que los elementos regulatorios predichos por esta herramienta bioinformática están basados en la regulación de *S. cerevisiae* y podrían no estar siendo detectados todos aquellos que se encuentran ejecutando una función en estos genes.

En *C. albicans*, los cambios fenotípicos están asociados a su potencial adaptativo. Los cambios fenotípicos abruptos, como una mayor hidrofobicidad en la superficie celular, afectan la adhesión a superficies sólidas y la floculación en medio líquido, debido a las diferencias proteómicas resultantes de la ambigüedad de codones (Miranda et al., 2007; Moura et al., 2010). Las cepas de *D. hansenii* también tienen una buena adhesión y motilidad de deslizamiento, a pesar de no tener la capacidad para formar pseudomicelios como *C. albicans* (Gori et al., 2011). En este trabajo se estudió el crecimiento de *D. hansenii* en diversas condiciones de estrés (medio sólido/líquido con salinidad, acidez, alcalinidad o choque de H₂O₂) para identificar el cambio de morfotipo como indicador de la inducción de la ambigüedad de la traducción. La variación fenotípica observada podría estar relacionada con el aumento de la hidrofobicidad de la superficie celular en respuesta a las condiciones extremas, tal y como se ha informado previamente (Segal-Kischinevzky et al., 2022).

La concentración de las aaRS y de los tRNA está relacionada directamente con la ambigüedad de codones. El desequilibrio en la poza de tRNA puede hacer que las aaRS carguen un aminoácido no canónico en un determinado tRNA, especialmente en aquellos que no se utilizan con frecuencia (Parker & Friesen, 1980; Precup et al., 1989). Swanson *et al.* (1988) describieron que la sobreexpresión de la GlnRS de *E. coli* da lugar a la aminoacilación del tRNA^{Tyr} con Gln, y esto puede evitarse con la sobreexpresión del tRNA^{Gln} (Swanson et al., 1988). Debido a esto, en este trabajo se analizaron los niveles de expresión de los genes que codifican para las aaRS y del tRNA_{CAG}, implicados en la ambigüedad del codón CUG en *D. hansenii* y se encontró que las concentraciones de estos transcritos eran diferentes de acuerdo con la condición fisiológica de la levadura.

La presencia del transcrito tRNA_{CAG} en *D. hansenii* es considerado un indicador de ambigüedad de codones. Durante el crecimiento logarítmico, el tRNA_{CAG} está subexpresado en todas las condiciones probadas, por lo que la levadura podría contrarrestar el estrés sin necesidad de utilizar la ambigüedad como mecanismo de adaptación. Sin embargo, en la fase de crecimiento estacionaria, el tRNA_{CAG} estaba sobreexpresado, y dado esto, la ambigüedad de codones podría ser promovida en esta etapa fisiológica. La única excepción es en pH 8.5, donde la expresión del tRNA_{CAG} permaneció regulada a la baja tanto en la fase logarítmica como en la estacionaria, lo que indica que la ambigüedad de codones podría no ser esencial para hacer frente al estrés alcalino.

Por otro lado, la propia expresión de las aaRS es también determinante para la aminoacilación, ya que el cargado del tRNA depende de las concentraciones de SerRS y LeuRS libres para realizar su función. La concentración de estas proteínas da lugar a una

distinta probabilidad de serinar o leucilar al tRNA_{CAG} de forma ambigua. En todas las fases de crecimiento, las aaRScyt y las aaRSmit para el mismo aminoácido se expresaron de forma similar, excepto para el pH 8.5 en cualquiera de las dos fases de crecimiento y para el H₂O₂ sólo en la fase estacionaria de crecimiento. Experimentalmente, no está claro cuál de las dos isoformas LeuRS y cuál de las dos SerRS es la responsable de la aminoacilación, pero como se expresaron por igual en la mayoría de las condiciones probadas, se puede asumir que cualquiera de ellas podría cargar al tRNA.

Para analizar más a fondo la posibilidad de serinación o leucilación de los tRNA por las aaRS, también consideramos la expresión de otros tRNA para Serina y para Leucina. La expresión de estos tRNA, que tienen un bajo uso de codones en *D. hansenii*, los hace adecuados como controles de la expresión basal de los tRNA para Leucina y para Serina bajo las condiciones de estrés evaluadas. Los codones que codifican los tRNA de Serina y de Leucina utilizados, además, presentan una distribución en las vías metabólicas de *D. hansenii* muy distinta a la de los codones CTG. Casi todos los codones CTT de Leucina y TCG de Serina están distribuidos homogéneamente en las vías metabólicas de *D. hansenii* mientras que el codón CTG ambiguo no.

Es notable que estos tRNA de Leucina y Serina también tienen una expresión diferencial en cada condición de estrés. Durante la fase estacionaria de crecimiento en condiciones alcalinas y oxidativas, el tRNA^{Leu} se expresó en niveles similares a los de la condición de referencia, mientras que el tRNA^{Ser} y el tRNA_{CAG} se expresaron en menor proporción, haciendo más probable el cargado con Serina del tRNA_{CAG}, ya que la SerRS expresada no estaría siendo utilizada para cargar al otro tRNA^{Ser}.

De forma similar, tras un choque con H₂O₂ durante la fase de crecimiento logarítmico, el tRNA^{Ser} se expresó de forma similar al gen de referencia, mientras que el tRNA^{Leu} se expresó en menor proporción, lo que sugiere que es más probable que se produzca la leucilación del tRNA_{CAG} en esta condición.

En la acidez, hubo una mayor expresión del tRNA^{Ser} que de los otros dos tRNA en ambas fases de crecimiento, lo que sugiere una mayor probabilidad de leucilación del tRNA_{CAG} debido a que la SerRS expresada estaría siendo utilizada para cargar al tRNA^{Ser} con Serina.

En la condición sin NaCl en la fase de crecimiento estacionario, la expresión del tRNA^{Ser} y del tRNA^{Leu} fue significativamente mayor que la del tRNA_{CAG}, indicando que este último se cargará preferentemente con Serina.

En 2.4 M de NaCl, en la fase de crecimiento logarítmico, los siete genes están regulados a la baja y se expresan de forma similar a los basales, lo que indica que no hay preferencia por la leucilación o la serinación en esta condición. Sin embargo, en la fase de crecimiento estacionario, todos los genes están sobreexpresados. En particular, los genes de la LeuRScit y del tRNA_{CAG} se expresaron aún más que los demás genes evaluados, lo que sugiere que

se prefiere la leucilación del tRNA en esta situación, en la que no sólo ha habido un largo tiempo de adaptación al estrés salino, sino también el agotamiento de los nutrientes.

El gen de la SerRScyt se encuentra presente en los experimentos de expresión en todo momento, algo que parece correlacionarse con los elementos regulatorios presentes en el promotor hipotético encontrados para este gen. El tRNA_{CAG} podría estar preferentemente cargado con Serina por esta situación y, si en determinado momento la célula se encuentra en estrés, el gen de las LeuRS podría expresarse en mayor medida permitiendo así la alternancia de los dos aminoácidos en los codones CUG. A pesar de esto, los experimentos mostrados en este trabajo no parecen explicar completamente los porcentajes de 97-3% sobre la presencia de Serina y Leucina en los codones CUG. Sin embargo, la expresión sí es diferencial, por lo que se sugiere que los cambios que pueden tener a partir de condiciones de estrés y que se han reportado en los ensayos con *C. albicans* serían explicados por este mecanismo de regulación génica.

La limitación más fuerte del presente trabajo es la falta de pruebas experimentales que evidencien de manera sólida las correlaciones que se están denotando aquí, sin embargo, existen diversos estudios que muestran que la ambigüedad de codones sucede de una manera adaptativa ante condiciones de estrés ambiental. Por ejemplo, *Bacillus subtilis* tiene altos niveles de traducción incorrecta cuando se crece a bajas temperaturas en fase estacionaria (Meyerovich et al., 2010). De forma similar, *Mycobacterium smegmatis* incrementa su rango de mala traducción cuando es crecida en pH bajo en fase estacionaria de cultivo (Javid et al., 2014). También ante la falta de nutrientes y de ciertos aminoácidos, al no haber una concentración suficiente de sustrato, las aaRS tienen una mayor probabilidad de tomar un sustrato distinto para aminoacilar al tRNA. Este fenómeno se ha observado en respuesta a la falta de Phe, donde la Leu es utilizada en los codones UUC, y durante la falta de Asn, donde la Lys es utilizada en los codones AAU y AAC (Mohler & Ibba, 2017). En *S. cerevisiae* se han observado diversos casos donde la mala-aminoacilación de los tRNA ocurre por la presencia de agentes externos que producen un estrés en la célula. Tal es el caso del metilmetano sulfato (MMS) que provoca un desbalance en la expresión de los tRNA de la levadura, permitiendo que algunas de las aaRS se equivoquen y coloquen un aminoácido incorrecto en ciertos tRNA que están sobreexpresados (Pang et al., 2014). Incluso hay evidencia bioquímica y genética de que pueden existir dos LeuRS que podrían haber evolucionado para conferir una ventaja adaptativa a *Sulfolobus islandicus* a las condiciones fluctuantes de estrés ambiental en ventilas hidrotermales ya que una realizaría el cargado de Leucina canónico mientras que la otra lo realizaría de manera ambigua (Weitzel et al., 2020).

Debido a todo esto es posible proponer un modelo de la competencia de las aaRS para cargar al tRNA_{CAG} con Serina o Leucina basado en el estrés ambiental y la expresión diferencial de los genes en *D. hansenii* (Fig. 18). Los genes tRNA_{CAG}, tRNA^{Ser} y tRNA^{Leu}, así

como los genes codificantes para las SerRS y las LeuRS, se expresan constantemente, pero de forma regulada. Las dos SerRS cargan Serina en el tRNA^{Ser} y las dos LeuRS cargan Leucina en el tRNA^{Leu}, mientras que el tRNA_{CAG} puede ser aminoacilado por cualquiera de ellas. La ocupación de los sitios activos de SerRS con tRNA^{Ser} y la de LeuRS con tRNA^{Leu} establece una competencia por cargar Serina o Leucina en el tRNA_{CAG}. Bajo estrés ambiental, la concentración de cada componente implicado en la ambigüedad varía, dando lugar a diferentes proporciones de tRNA_{CAG} cargados con Serina o con Leucina, desencadenando una composición disímil de las proteínas con residuos codificados por CUG, que finalmente puede alterar al proteoma y a las estructuras celulares.

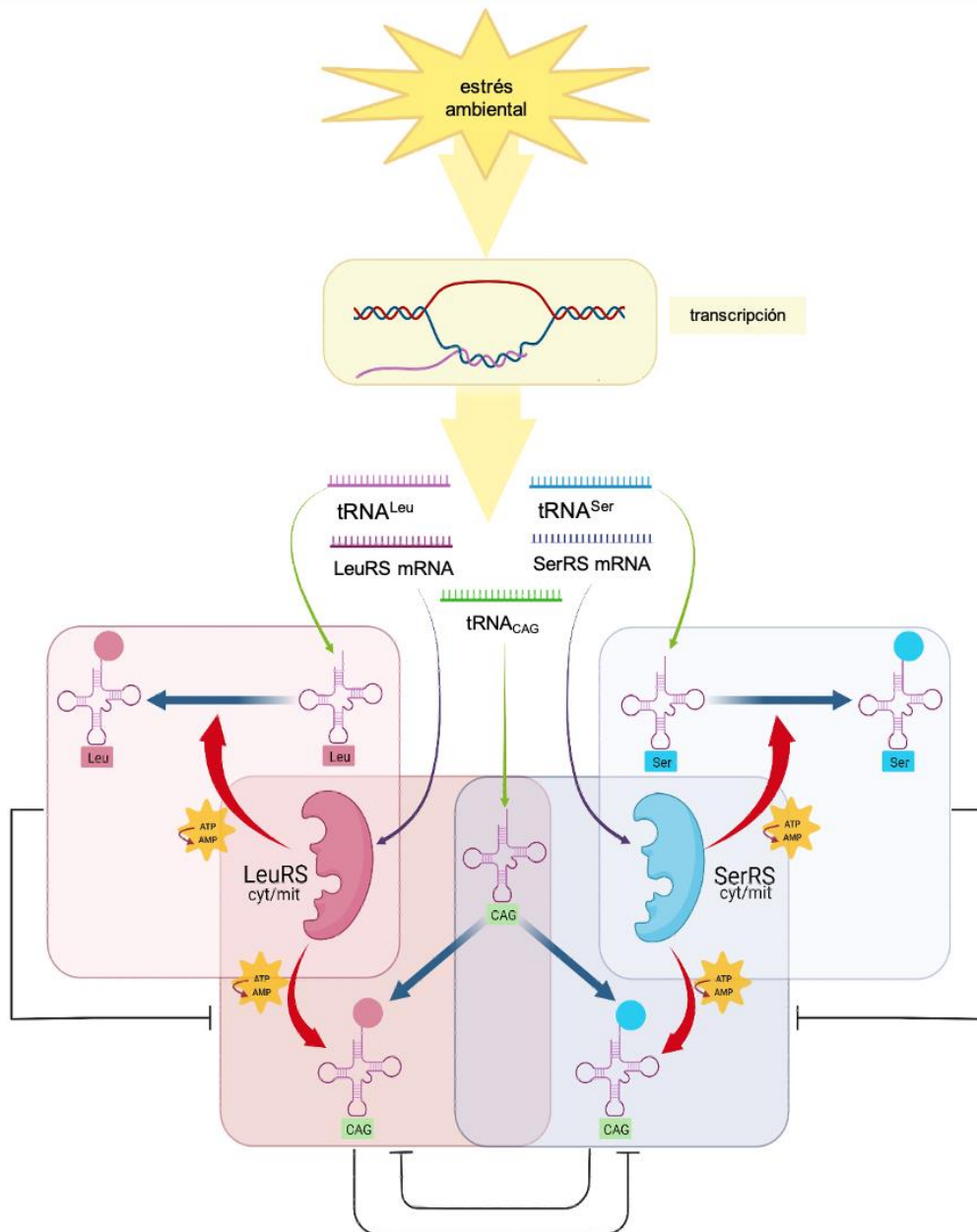


Figura 18. Aminoacilación del tRNA_{CAG} con Leucina o Serina. Diferentes condiciones de estrés alteran la expresión de las aaRS y los tRNA. Los transcritos de aaRS se traducen en proteínas LeuRS y SerRS (flechas moradas). La expresión de los tRNA (flechas verdes) en diferentes proporciones, establece una competencia por su aminoacilación. Los cambios en la concentración del tRNA^{Ser} y del tRNA^{Leu} alteran las proporciones de sitios activos disponibles para la carga del tRNA_{CAG} con Leucina o con Serina (tRNA_{CAG}^{Leu}/tRNA_{CAG}^{Ser}) por la actividad de aaRS (flechas rojas). Una mayor concentración del tRNA_{CAG} cargado con cualquiera de los dos aminoácidos (flechas azules) podría cambiar la proporción de Leucina y de Serina en el proteoma de *D. hansenii*. Cada reacción de aminoacilación está encerrada en un rectángulo de color, y la competencia se representa con líneas negras de inhibición, considerando que la ocurrencia de una reacción inhibe a la otra. Creado con biorender.com.

La potencial capacidad de los proteomas del clado CTG-Ser1 para diversificar su pI y perfil de hidropatía a partir de la ambigüedad del codón CUG, podría ser un indicio de hasta qué punto las proteínas se ven afectadas a nivel físicoquímico por la incorporación de uno u otro aminoácido. La Serina contribuye favorablemente a la solubilidad de las proteínas: Trevino y colaboradores (2007), informaron de un aumento de la solubilidad al sustituir por Serina la mayoría de los residuos hidrofóbicos de la superficie de la proteína (Trevino et al., 2007).

A partir del trabajo realizado en esta tesis se publicó un artículo en donde se identificaron sólo 16 proteínas que tenían su pI alterado cuando se cambiaron los residuos codificados por CUG por Leucina en vez de Serina, pero 1342, 2013 o 2654 tenían un cambio de hidropatía según diferentes escalas de hidrofobicidad (Ochoa-Gutiérrez et al., 2022).

Aunque *D. hansenii* puede vivir en rangos de pH de 3 a 10, sus proteínas no parecen requerir un cambio en el pI para adaptarse a los desafíos ambientales que puedan presentarse. *C. albicans* tampoco mostró ninguna variación de pI en ninguna de sus proteínas. Sin embargo, los valores de hidropatía sí cambiaron sustancialmente en ambas levaduras, particularmente en una mayor proporción en *D. hansenii*, lo que indica que la modificación más importante entre las características físicoquímicas de las proteínas de estos organismos está en sus interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas con el medio (Gori et al., 2011; Miranda et al., 2013; Ochoa-Gutiérrez et al., 2022).

D. hansenii y *C. albicans* parecen tener, además, un proceso de selección para conservar los codones CTG en ciertos genes de ciertas vías metabólicas más que en otros, debido probablemente, a la capacidad de ser cargado por dos aminoácidos que tienen diferentes propiedades físicoquímicas. Esto se hace más evidente al momento de compararlo con la distribución de codones CTG en *S. cerevisiae*, donde parecieran estar distribuidos en todas las vías metabólicas sin ninguna distinción aparente. Existen, también, ciertas rutas metabólicas en las que hay una muy baja presencia de genes con más de 10 codones CTG.

Los codones CTG en el proteoma de *D. hansenii* se presentan más en genes implicados en el metabolismo de lípidos, de transporte, señalización, membrana, crecimiento y muerte celular. Todas estas vías metabólicas están relacionadas con lípidos que requieren de proteínas más hidrofóbicas para poder interactuar con ellos. La mayoría de los genes afectados tanto en la proporción de codones CTG, como de la hidropatía reportada previamente, están relacionados con las funciones de transporte y aquellos asociados a membranas y mitocondrias. La selección natural parecería estar restringiendo el uso de ciertos codones sobre otros en las diferentes rutas metabólicas de la célula.

Además de esto, al observar la ultraestructura celular en las diferentes condiciones de estrés, el grosor de la pared celular aumenta notablemente en condiciones de 2.4 M de NaCl y H₂O₂, lo que constituye un sello distintivo de la respuesta al estrés en muchos hongos, ya que la morfología y la integridad de la pared celular constituyen la primera línea de defensa

frente a entornos adversos. El engrosamiento de la pared celular está directamente correlacionado con la pérdida de permeabilidad bajo condiciones de estrés ambiental, como la alta osmolaridad o el estrés oxidante, lo que resulta en una mayor resistencia a los compuestos pro-oxidantes o dañinos al limitar su difusión en la célula (Lin et al., 2022; Ribeiro et al., 2022; Sousa-Lopes et al., 2004).

Las variaciones en la morfología de las colonias y en los componentes celulares reportadas en este trabajo podrían atribuirse a las modificaciones proteómicas por la hidropatía y la distribución de los codones CTG en las vías metabólicas aquí descritas. Las diferentes proteínas de la pared celular interactúan con las membranas a través de los glucanos, actuando como moléculas enlazadoras que unen a las diferentes proteínas de la pared celular al núcleo de quitina a través de las proteínas glucosil-fosfatidilinositol. La correcta interacción tanto con los lípidos como con el β -1,3-glucano de las proteínas de la membrana y de la pared celular depende de su hidropatía (García-Rubio et al., 2019). La vacuolización, el contenido granular y el vacío en la vacuola también están asociados al desequilibrio de la hidropatía en condiciones de estrés en las levaduras (Sharma & Srivastava, 2014). En la vacuola, los esteroides y los lípidos saturados, como los esfingolípidos, se agrupan y generan dominios de membrana a los que se unen preferentemente las proteínas con afinidad (Tsuji & Fujimoto, 2018). En las mitocondrias, hay varias características asociadas a la hidropatía de las proteínas que permiten la correcta formación de las crestas y la estructura morfológica. La membrana externa está particularmente enriquecida en fosfolípidos, mientras que la membrana interna tiene una concentración de proteínas inusualmente alta (Mårtensson et al., 2017). Las crestas mitocondriales se encuentran entre las membranas más ricas en proteínas de la célula, y la mitad del volumen hidrofóbico de la membrana está ocupado por proteínas. Este alto grado de proteínas perjudicaría el acoplamiento hidrofóbico entre las proteínas y los lípidos, a menos que existan mecanismos estabilizadores (Schlame, 2021). La baja proporción de lípidos a proteínas puede causar una difusión anómala, agrupación de proteínas y deformaciones de la membrana debido al desajuste hidrofóbico entre el núcleo no polar de la bicapa lipídica y los dominios proteicos no polares (Guigas & Weiss, 2016). Uno de los mecanismos más eficaces de reducción de la tensión en las membranas atestadas, es la agregación de proteínas de membrana, lo que a su vez aumenta la hidrofilia (Mårtensson et al., 2017). El resultado de la alteración de las interacciones proteicas producida por las diferentes proporciones de serinación o leucilación en las proteínas asociadas a los lípidos en estos orgánulos, apoyan las alteraciones ultraestructurales observadas: membranas de pared celular discontinuas o rotas, vacuolas vacías granulares y modificaciones de las mitocondrias.

La capacidad de serinar o leucilar al codón CUG en *D. hansenii* y otros miembros de clado CTG-Ser1 es un proceso extremadamente complejo y depende no sólo de la afinidad

de las SerRS y LeuRS por el tRNA_{CAG}, como se ha sugerido previamente (Ji et al., 2016; Rocha et al., 2011), sino también de la disponibilidad de tRNA que puedan ser cargados por estas aaRS e incluso de las concentraciones de otros componentes como aminoácidos y factores de traducción y transcripción. En este trabajo se encontraron variaciones significativas entre los perfiles de expresión de los genes asociados a la ambigüedad del codón CUG en condiciones de salinidad, acidez, alcalinidad y estrés oxidante. Se propone, sobre todo, que estos perfiles de expresión podrían estar correlacionados con cambios fenotípicos en las células de *D. hansenii* expuestas a diferentes condiciones de estrés y que hay una relación directa con la selección de estos codones en las diferentes vías metabólicas de *D. hansenii* que le permiten adaptarse a los ambientes contra los que tiene que contender.

7. Conclusiones

- El tRNA_{CAG} de *D. hansenii* posee un 96% de identidad con el de *C. albicans*, además de conservar su estructura secundaria y las características de la secuencia que permitirían su reconocimiento por las dos aaRS diferentes.
- No todos los miembros del clado CTG-Ser1 conservan los elementos para traducir ambiguamente o pueden ser reconocidos por LeuRS y SerRS. *Candida tropicalis*, *Metschnikowia bicuspidata* y *Babjeviella inositovora* no poseen los sitios de doble reconocimiento por lo que podrían estar traduciendo el codón CUG como Serina, pero no necesariamente también como Leucina.
- Los genes implicados en la ambigüedad de codones presentan elementos regulatorios asociados al estrés, excepto el gen de la SerRScyt.
- Las colonias de *D. hansenii* cambian tanto su morfotipo de colonia como su dinámica de crecimiento en las condiciones sin sal, 2.4 M de NaCl, pH 3.5 y pH 8.5.
- Existen variaciones significativas entre los perfiles de expresión de los genes asociados a la ambigüedad del codón CUG en condiciones de salinidad, acidez, alcalinidad y estrés oxidante.
- Los genes tRNA_{CAG}, tRNA^{Ser} y tRNA^{Leu}, así como los genes codificantes para las SerRS y las LeuRS, se expresan constantemente, pero de forma regulada. Por lo que se propone un modelo de la competencia de las aaRS para cargar al tRNA_{CAG} con Serina o Leucina basado en el estrés ambiental y la expresión diferencial de los genes.
- *D. hansenii* y *C. albicans* parecen conservar los codones CTG en ciertos genes en las vías metabólicas asociadas a lípidos y a membranas y transporte, más que en otras.
- En condiciones de 2.4 M de NaCl y H₂O₂, se produce un engrosamiento de la pared celular, lo que constituye un sello distintivo de la respuesta al estrés en muchos hongos.
- Existen alteraciones ultraestructurales como membranas de pared celular discontinuas o rotas, vacuolas granulares vacías y modificaciones de las mitocondrias, en condiciones de hipersalinidad, acidez, alcalinidad y estrés oxidante.
- La capacidad de serinar o leucilar al codón CUG en *D. hansenii* y otros miembros de clado CTG-Ser1 es un proceso complejo y depende de la disponibilidad de tRNA que

puedan ser cargados por las aaRS de Serina y de Leucina, así como del tRNA_{CAG} ambiguo.

8. Perspectivas

Los resultados obtenidos en este proyecto permiten abrir una nueva brecha de conocimiento con respecto al uso ambiguo de codones como adaptación al estrés ambiental, además de permitir replantear diversas discusiones sobre la invariabilidad del código genético cuestionablemente llamado universal y estricto. Debido a la complejidad y extensión del tema en este trabajo, a continuación, se proponen diversas perspectivas para dirigir el flujo de esta investigación.

Primero que nada, es interesante el hecho de que los genes implicados en la ambigüedad de codones presentan elementos regulatorios asociados al estrés, excepto en el gen de la SerRS_{Cyt}; además de que se observó una regulación diferencial de los genes en diversas condiciones. Es por eso que se propone realizar un análisis más profundo de los elementos regulatorios de estos genes utilizando la mutagénesis dirigida para determinar si estas cajas de reconocimiento están realmente asociadas a las condiciones de estrés descritas. Por otro lado, también se propone la clonación de los promotores de cada una de las aaRS en sus genes parálogos para observar posibles cambios en la expresión y determinar si son estos los únicos factores que promueven la expresión diferencial que se ha observado en este trabajo.

De igual manera, es de vital importancia determinar la interacción que existe entre las SerRS y las LeuRS con el tRNA_{CAG} de *D. hansenii*. Esto con el fin de conocer si hay la misma afinidad por todas las aaRS de la misma manera o si se presenta alguna que tenga una mayor posibilidad de interactuar con el tRNA_{CAG}. En este trabajo se determinó por identidad de secuencias que es posible una interacción similar a la que se ha demostrado experimentalmente en *C. albicans*, pero es necesario continuar con experimentos como el EMSA o Northwestern blot que permitan dilucidar experimentalmente si existe esta misma asociación entre las proteínas y el tRNA de *D. hansenii*.

También es importante para futuros trabajos de otras especies, recalcar que *Candida tropicalis*, *Metschnikowia bicuspidata* y *Babjeviella inositovora* no poseen los sitios de doble reconocimiento de las SerRS y las LeuRS, por lo que sería interesante para otras investigaciones centradas en estos organismos determinar de forma experimental si podrían estar traduciendo el codón CUG como Serina, pero no necesariamente también como Leucina, o viceversa.

Los genes tRNA_{CAG}, tRNA^{Ser} y tRNA^{Leu}, así como los genes codificantes para las SerRS y las LeuRS, se expresan constantemente, pero de forma regulada. También se encontró que ciertos genes poseen una mayor cantidad de codones CUG que otros y debido a que muchos de ellos pueden tener cambios importantes en su hidrofobicidad, sería interesante evaluar si aquellos genes codifican para proteínas que son más cargadas con uno

u otro aminoácido dependiendo de la condición de estrés que se presente. Esto se podría resolver con ayuda de un gel de doble dimensión en donde se ubiquen a las proteínas implicadas y que después de ser secuenciadas puedan ser analizadas por cromatografía para evaluar el cargado diferencial con Serina o Leucina de las posiciones donde se encuentra un codón CUG codificante. Resultaría de vital importancia calcular el porcentaje de cargado experimental que tienen estas proteínas implicadas en las vías metabólicas ya descritas en este trabajo en las posiciones donde codifican para codones CUG en las distintas condiciones de estrés aquí descritas.

Además, sería interesante evaluar la expresión de los otros genes que transcriben para los otros tRNA de Serina y de Leucina y considerarlos dentro del *pool* de tRNA que compiten por el cargado de las aaRS. Esto permitiría tener un panorama más amplio de la competencia por el cargado de aminoácidos en los tRNA que se está sugiriendo en este trabajo.

Por último, se sugiere explorar también las alteraciones ultraestructurales encontradas aquí. El engrosamiento de la pared celular, las membranas de pared celular discontinuas o rotas, las vacuolas granulares vacías y las modificaciones de las mitocondrias, en condiciones de hipersalinidad, acidez, alcalinidad y estrés oxidante en organismos con la capacidad de tener ambigüedad de codones, son procesos prácticamente nuevos. Será muy importante en un futuro poder demostrar la localización de las proteínas de *D. hansenii*, que ya han sido descritas como proteínas con codones codificantes CUG ambiguos, en las estructuras celulares que aquí se describen. Esto constituiría una nueva aproximación hacia las adaptaciones fisicoquímicas que las proteínas pueden tener para contender contra condiciones de estrés ambiental en levaduras y en organismos extremófilos.

9. Referencias bibliográficas

- Allawi, H. T., and Santa Lucia, J. (1997). Thermodynamics and NMR of internal G-T mismatches in DNA. *Biochemistry*, 36(34), 10581-10594.
<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>
- Aubee, J. I., Olu, M., & Thompson, K. M. (2016). The i6A37 tRNA modification is essential for proper decoding of UUX-Leucine codons during rpoS and iraP translation. *RNA (New York, N.Y.)*, 22(5), 729-742. <https://doi.org/10.1261/rna.053165.115>
- Berg, M. D., Genereaux, J., Zhu, Y., Mian, S., Gloor, G. B., & Brandl, C. J. (2018). Acceptor Stem Differences Contribute to Species-Specific Use of Yeast and Human tRNAs^{er}. *Genes*, 9(12), 612. <https://doi.org/10.3390/genes9120612>
<http://cgsigma.cshl.org/jian>
- Breuer, U., & Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii*—An extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23(6), 415-437. <https://doi.org/10.1002/yea.1374>
- Bullwinkle, T., Lazazzera, B., & Ibba, M. (2014). Quality control and infiltration of translation by amino acids outside of the genetic code. *Annual Review of Genetics*, 48, 149-166. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120213-092101>
- Chan, C. T. Y., Pang, Y. L. J., Deng, W., Babu, I. R., Dyavaiah, M., Begley, T. J., & Dedon, P. C. (2012). Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins. *Nature Communications*, 3, 937. <https://doi.org/10.1038/ncomms1938>
- Chan, P. P., & Lowe, T. M. (2019). tRNAscan-SE: Searching for tRNA Genes in Genomic Sequences. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1962, 1-14. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_1
<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>

- Cvetesic, N., Semanjski, M., Soufi, B., Krug, K., Gruic-Sovulj, I., & Macek, B. (2016). Proteome-wide measurement of non-canonical bacterial mistranslation by quantitative mass spectrometry of protein modifications. *Scientific Reports*, 6(1), Art. 1.
- Davis, M. W., & Jorgensen, E. M. (2022). ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program. *Frontiers in Bioinformatics*, 2. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbinf.2022.818619>
- De la Fuente-Colmenares I., González J., Ochoa-Gutiérrez D., Norma S.S., Escobar-Sánchez V., Segal-Kischinevzky C. Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX; Mexico City, México: 2022. Manuscrito en preparación.
- Edelmann P, Gallant J (1977) Mistranslation in *E. coli*. *Cell*. 10:131–137.
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M., & Wall, R. (1984). Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *Journal of Molecular Biology*, 179(1), 125-142. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(84\)90309-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(84)90309-7)
- Eisenberg, D., Weiss, R. M., & Terwilliger, T. C. (1984). The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(1), 140-144. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.1.140>
- Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J., & Trevijano-Contador, N. (2019). The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2993. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02993>
- González, J., Castillo, R., García-Campos, M. A., Noriega-Samaniego, D., Escobar-Sánchez, V., Romero-Aguilar, L., Alba-Lois, L., & Segal-Kischinevzky, C. (2020). Tolerance to Oxidative Stress in Budding Yeast by Heterologous Expression of Catalases A and T from *Debaryomyces hansenii*. *Current Microbiology*, 77(12), 4000-4015. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02237-3>
- Gonzalez, N. A., Vázquez, A., Ortiz Zuazaga, H. G., Sen, A., Olvera, H. L., Peña de Ortiz, S., & Govind, N. S. (2009). Genome-wide expression profiling of the osmoadaptation

- response of *Debaryomyces hansenii*. *Yeast (Chichester, England)*, 26(2), 111-124.
<https://doi.org/10.1002/yea.1656>
- Gori, K., Knudsen, P. B., Nielsen, K. F., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2011). Alcohol-based quorum sensing plays a role in adhesion and sliding motility of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 11(8), 643-652.
<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00755.x>
- Gori, K., Sørensen, L. M., Petersen, M. A., Jespersen, L., & Arneborg, N. (2012). *Debaryomyces hansenii* strains differ in their production of flavor compounds in a cheese-surface model. *MicrobiologyOpen*, 1(2), 161-168.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.11>
- Guigas, G., & Weiss, M. (2016). Effects of protein crowding on membrane systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858(10), 2441-2450.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.12.021>
- Hoffman, K. S., O'Donoghue, P., & Brandl, C. J. (2017). Mistranslation: From adaptations to applications. *Biochimica et Biophysica Acta. General Subjects*, 1861(11 Pt B), 3070-3080. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.01.031>
- Jamieson, D. J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(16), 1511-1527. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199812\)14:16<1511::AID-YEA356>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1511::AID-YEA356>3.0.CO;2-S)
- Javid, B., Sorrentino, F., Toosky, M., Zheng, W., Pinkham, J. T., Jain, N., Pan, M., Deighan, P., & Rubin, E. J. (2014). Mycobacterial mistranslation is necessary and sufficient for rifampicin phenotypic resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(3), 1132-1137.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1317580111>
- Ji, Q.-Q., Fang, Z.-P., Ye, Q., Ruan, Z.-R., Zhou, X.-L., & Wang, E.-D. (2016). C-terminal Domain of Leucyl-tRNA Synthetase from Pathogenic *Candida albicans* Recognizes both tRNA^{Ser} and tRNA^{Leu}*. *Journal of Biological Chemistry*, 291(7), 3613-3625.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.699777>

- Kanehisa, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2016). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *Journal of Molecular Biology*, 428(4), 726-731.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006>
<https://www.kegg.jp/blastkoala/>
- Kawaguchi, Y., Honda, H., Taniguchi-Morimura, J., & Iwasaki, S. (1989). The codon CUG is read as serine in an asporogenic yeast *Candida cylindracea*. *Nature*, 341(6238), 164-166. <https://doi.org/10.1038/341164a0>
- Kozlowski, L. P. (2017). Proteome-pl: Proteome isoelectric point database. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D1112-D1116. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw978>
<https://isoelectricpointdb.org/>, consultada el 15 de julio de 2021
- Krassowski, T., Coughlan, A. Y., Shen, X.-X., Zhou, X., Kominck, J., Ofulente, D. A., Riley, R., Grigoriev, I. V., Maheshwari, N., Shields, D. C., Kurtzman, C. P., Hittinger, C. T., Rokas, A., & Wolfe, K. H. (2018). Evolutionary instability of CUG-Leu in the genetic code of budding yeasts. *Nature Communications*, 9(1), 1887.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04374-7>
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105-132.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- Ladner, J. E., Jack, A., Robertus, J. D., Brown, R. S., Rhodes, D., Clark, B. F., & Klug, A. (1975). Structure of yeast phenylalanine transfer RNA at 2.5 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(11), 4414-4418.
- Lant, J. T., Berg, M. D., Heinemann, I. U., Brandl, C. J., & O'Donoghue, P. (2019). Pathways to disease from natural variations in human cytoplasmic tRNAs. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(14), 5294-5308.
<https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.002982>
- Lee, J. Y., Kim, D. G., Kim, B.-G., Yang, W. S., Hong, J., Kang, T., Oh, Y. S., Kim, K. R.,

- Han, B. W., Hwang, B. J., Kang, B. S., Kang, M.-S., Kim, M.-H., Kwon, N. H., & Kim, S. (2014). Promiscuous methionyl-tRNA synthetase mediates adaptive mistranslation to protect cells against oxidative stress. *Journal of Cell Science*, *127*(Pt 19), 4234-4245. <https://doi.org/10.1242/jcs.152470>
- Lin, N.-X., Xu, Y., & Yu, X.-W. (2022). Overview of yeast environmental stress response pathways and the development of tolerant yeasts. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, *2*(2), 232-245. <https://doi.org/10.1007/s43393-021-00058-4>
- Lowe, T. M., & Chan, P. P. (2016). tRNAscan-SE On-line: Integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Research*, *44*(W1), W54-57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw413>
<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>
- Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A. R. N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., Madhusoodanan, N., Kolesnikov, A., & Lopez, R. (2022). Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Research*, gkac240. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
- Mårtensson, C. U., Doan, K. N., & Becker, T. (2017). Effects of lipids on mitochondrial functions. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1862*(1), 102-113. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.06.015>
- Meyerovich, M., Mamou, G., & Ben-Yehuda, S. (2010). Visualizing high error levels during gene expression in living bacterial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(25), 11543-11548. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912989107>
- Miranda, I., Rocha, R., Santos, M. C., Mateus, D. D., Moura, G. R., Carreto, L., & Santos, M. A. S. (2007). A genetic code alteration is a phenotype diversity generator in the human pathogen *Candida albicans*. *PloS One*, *2*(10), e996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000996>
- Miranda, I., Silva-Dias, A., Rocha, R., Teixeira-Santos, R., Coelho, C., Gonçalves, T., Santos, M. A. S., Pina-Vaz, C., Solis, N. V., Filler, S. G., & Rodrigues, A. G. (2013). *Candida albicans* CUG Mistranslation Is a Mechanism To Create Cell Surface

- Variation. *mBio*, 4(4), e00285-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00285-13>
- Mohler, K., & Ibba, M. (2017). Translational fidelity and mistranslation in the cellular response to stress. *Nature Microbiology*, 2, 17117. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.117>
- Mohler, K., Mann, R., Bullwinkle, T. J., Hopkins, K., Hwang, L., Reynolds, N. M., Gassaway, B., Aerni, H.-R., Rinehart, J., Polymenis, M., Faull, K., & Ibba, M. (2017). Editing of misaminoacylated tRNA controls the sensitivity of amino acid stress responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 45(7), 3985-3996. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx077>
- Mortensen, H. D., Jacobsen, T., Koch, A. G., & Arneborg, N. (2008). Intracellular pH Homeostasis Plays a Role in the Tolerance of *Debaryomyces hansenii* and *Candida zeylanoides* to Acidified Nitrite. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15), 4835-4840. <https://doi.org/10.1128/AEM.00571-08>
- Moura, G. R., Paredes, J. A., & Santos, M. A. S. (2010). Development of the genetic code: Insights from a fungal codon reassignment. *FEBS Letters*, 584(2), 334-341. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.11.066>
- Nakamura, Y., Gojobori, T., & Ikemura, T. (2000). Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: Status for the year 2000. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 292. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.292>
<https://www.kazusa.or.jp/codon/>.
- Navarrete, C., Siles, A., Martínez, J. L., Calero, F., & Ramos, J. (2009). Oxidative stress sensitivity in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 9(4), 582-590. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00500.x>
- Ochoa-Gutiérrez, D., Reyes-Torres, A. M., de la Fuente-Colmenares, I., Escobar-Sánchez, V., González, J., Ortiz-Hernández, R., Torres-Ramírez, N., & Segal-Kischinevsky, C. (2022). Alternative CUG Codon Usage in the Halotolerant Yeast *Debaryomyces hansenii*: Gene Expression Profiles Provide New Insights into Ambiguous Translation. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 8(9), 970.

<https://doi.org/10.3390/jof8090970>

Pang, Y. L. J., Abo, R., Levine, S. S., & Dedon, P. C. (2014). Diverse cell stresses induce unique patterns of tRNA up- and down-regulation: TRNA-seq for quantifying changes in tRNA copy number. *Nucleic Acids Research*, *42*(22), e170.

<https://doi.org/10.1093/nar/gku945>

Parker, J., & Friesen, J. D. (1980). «Two out of three» codon reading leading to mistranslation *in vivo*. *Molecular & General Genetics: MGG*, *177*(3), 439-445.

<https://doi.org/10.1007/BF00271482>

Perreau, V. M., Keith, G., Holmes, W. M., Przykorska, A., Santos, M. A., & Tuite, M. F. (1999). The *Candida albicans* CUG-decoding ser-tRNA has an atypical anticodon stem-loop structure. *Journal of Molecular Biology*, *293*(5), 1039-1053.

<https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3209>

Precup, J., Ulrich, A. K., Roopnarine, O., & Parker, J. (1989). Context specific misreading of phenylalanine codons. *Molecular & General Genetics: MGG*, *218*(3), 397-401.

<https://doi.org/10.1007/BF00332401>

Prista, C., González-Hernández, J. C., Ramos, J., & Loureiro-Dias, M. C. (2007). Cloning and characterization of two K⁺ transporters of *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology (Reading, England)*, *153*(Pt 9), 3034-3043.

<https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/006080-0>

Prista, C., Michán, C., Miranda, I. M., & Ramos, J. (2016). The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast*, *33*(10), 523-533.

<https://doi.org/10.1002/yea.3177>

Ramos-Moreno, L., Ramos, J., & Michán, C. (2019). Overlapping responses between salt and oxidative stress in *Debaryomyces hansenii*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *35*(11), 170. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2753-3>

Reynolds, N. M., Lazazzera, B. A., & Ibba, M. (2010). Cellular mechanisms that control mistranslation. *Nature Reviews. Microbiology*, *8*(12), 849-856.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro2472>

- Ribeiro, R. A., Bourbon-Melo, N., & Sá-Correia, I. (2022). The cell wall and the response and tolerance to stresses of biotechnological relevance in yeasts. *Frontiers in Microbiology*, 13, 953479. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.953479>
- Rocha, R., Pereira, P. J. B., Santos, M. A. S., & Macedo-Ribeiro, S. (2011). Unveiling the structural basis for translational ambiguity tolerance in a human fungal pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(34), 14091-14096. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102835108>
- Sánchez, N. S., Calahorra, M., Ramírez, J., & Peña, A. (2018). Salinity and high pH affect energy pathways and growth in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Biology*, 122(10), 977-990. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.07.002>
- Santos, M. A., Keith, G., & Tuite, M. F. (1993). Non-standard translational events in *Candida albicans* mediated by an unusual seryl-tRNA with a 5'-CAG-3' (leucine) anticodon. *The EMBO Journal*, 12(2), 607-616. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05693.x>
- Santos, M. A., Perreau, V. M., & Tuite, M. F. (1996). Transfer RNA structural change is a key element in the reassignment of the CUG codon in *Candida albicans*. *The EMBO Journal*, 15(18), 5060-5068.
- Santos, M. A. S., Gomes, A. C., Santos, M. C., Carreto, L. C., & Moura, G. R. (2011). The genetic code of the fungal CTG clade. *Comptes Rendus Biologies*, 334(8-9), 607-611. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2011.05.008>
- Schlame, M. (2021). Protein crowding in the inner mitochondrial membrane. *Biochimica et Biophysica Acta. Bioenergetics*, 1862(1), 148305. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148305>
- Schmitt, M. E., Brown, T. A., & Trumpower, B. L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 18(10), 3091-3092.
- Schwartz, M. H., & Pan, T. (2016). Temperature dependent mistranslation in a hyperthermophile adapts proteins to lower temperatures. *Nucleic Acids Research*,

44(1), 294-303. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1379>

- Schwartz, M., & Pan, T. (2017). Function and origin of mistranslation in distinct cellular contexts. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 52(2), 205-219. <https://doi.org/10.1080/10409238.2016.1274284>
- Segal-Kischinevsky, C., Rodarte-Murguía, B., Valdés-López, V., Mendoza-Hernández, G., González, A., & Alba-Lois, L. (2011). The euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii* has two catalase genes encoding enzymes with differential activity profile. *Current Microbiology*, 62(3), 933-943. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9806-z>
- Segal-Kischinevsky, C., Romero-Aguilar, L., Alcaraz, L. D., López-Ortiz, G., Martínez-Castillo, B., Torres-Ramírez, N., Sandoval, G., & González, J. (2022). Yeasts Inhabiting Extreme Environments and Their Biotechnological Applications. *Microorganisms*, 10(4), 794. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040794>
- Sharma, A., & Srivastava, S. (2014). Anti-*Candida* activity of two-peptide bacteriocins, plantaricins (PIn E/F and J/K) and their mode of action. *Fungal Biology*, 118(2), 264-275. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.12.006>
- Skoneczny, M., & Rytka, J. (2000). Oxygen and haem regulate the synthesis of peroxisomal proteins: Catalase A, acyl-CoA oxidase and Pex1p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; the regulation of these proteins by oxygen is not mediated by haem. *The Biochemical Journal*, 350 Pt 1, 313-319.
- Sousa-Lopes, A., Antunes, F., Cyrne, L., & Marinho, H. S. (2004). Decreased cellular permeability to H₂O₂ protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase against oxidative stress. *FEBS Letters*, 578(1-2), 152-156. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.090>
- Stothard, P. (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques*, 28(6), 1102, 1104. <https://doi.org/10.2144/00286ir01>
https://www.bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html
- Suzuki, T., Ueda, T., & Watanabe, K. (1997). The «polysemous» codon—A codon with

- multiple amino acid assignment caused by dual specificity of tRNA identity. *The EMBO Journal*, 16(5), 1122-1134. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.5.1122>
- Swanson, R., Hoben, P., Sumner-Smith, M., Uemura, H., Watson, L., & Söll, D. (1988). Accuracy of in vivo aminoacylation requires proper balance of tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4885), 1548-1551. <https://doi.org/10.1126/science.3144042>
- Trevino, S. R., Scholtz, J. M., & Pace, C. N. (2007). Amino acid contribution to protein solubility: Asp, Glu, and Ser contribute more favorably than the other hydrophilic amino acids in RNase Sa. *Journal of Molecular Biology*, 366(2), 449-460. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.026>
- Tsuji, T., & Fujimoto, T. (2018). Lipids and lipid domains of the yeast vacuole. *Biochemical Society Transactions*, 46(5), 1047-1054. <https://doi.org/10.1042/BST20180120>
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189-1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
<https://www.jalview.org/>
- Weitzel, C. S., Li, L., Zhang, C., Eilts, K. K., Bretz, N. M., Gatten, A. L., Whitaker, R. J., & Martinis, S. A. (2020). Duplication of leucyl-tRNA synthetase in an archaeal extremophile may play a role in adaptation to variable environmental conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 295(14), 4563-4576. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006481>
- Wiltschi, B. (2016). Incorporation of non-canonical amino acids into proteins in yeast. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 89, 137-156. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.02.002>
- Wright, R. (2000). Transmission electron microscopy of yeast. *Microscopy Research and Technique*, 51(6), 496-510.
- Zhu, J., & Zhang, M. Q. (1999). SCPD: A promoter database of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 15(7-8), 607-611. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/15.7.607>

Anexo 1

SCPD

The Promoter Database of *Saccharomyces cerevisiae*

<http://cgsigma.cshl.org/jian>

LeuRSmit

>TAGCATAAATAGATAGATTATAATGAGTTTGATGATTGTCCGTAATTCTATGTCTCGCAC
AAAAATTTATTCTGCCTAACGAATTGTGGAAAATTAAGATTCTATGAATACATAACTCACA
ACTTACCATTGCTGCCATCAGGATG

+	(20, 25)	BAS2	TAATGA
+	(23, 28)	GCN4	TGAGTT
+	(32, 37)	GCN4	TGATTG
+	(57, 63)	MSE	CACAAAA
+	(87, 93)	ECB	GGAAAAT
+	(99, 107)	HSTF	TTCTATGAA
+	(104, 109)	GCN4	TGAATA
-	(113, 118)	GCN4	TGAGTT

LeuRScyt

>GTTGTATAATTTACTACGTAACAATTACATGTTTATCATTTCCTATATAGACTATAATATA
CTAGTTTTGATTTTGACTAGTCTATTGACTGGATTTCGTATTTGTAGTTCCGGTATGAAGTA
CAAAATCCTTTTTCTATTGTGGTTTTTTTTTTCATACCTGCTCCTGTATACTAAAATAATA
AAGAAAGAAGGAGGTATAGATAAAATATCAACAACGGACAGAGAGTACATACGTAACAT
AGTGGCATTTCAAAACACCTAGACTAAGTGCTGGACTTCTATTGAATCTTAGAGACAA
GTAAAGGCGTTGAATTTAGAAGCCTTTTCAATATTGGAATAAATAAATAATCCACACACG
TATCAGTCAGTGGTGTTAATACTTCAACAAAATAAATAAACATATATAACTGGAGGCTATC
AGTATATGAGTTTTAAAACGGATACAAAATATTACAACAGGAAATCTATG

-	(22, 30)	MATalpha2	CATGTAATT
+	(27, 35)	MATalpha2	CATGTTTAT
+	(68, 73)	GCN4	TGATTT
+	(74, 79)	GCN4	TGACTA
+	(86, 91)	GCN4	TGACTG
+	(179, 184)	BAS2	TAATAA
+	(271, 276)	SWI5	TGCTGG
+	(287, 292)	GCN4	TGAATC

+	(313, 318)	GCN4	TGAATT
+	(342, 348)	BAS2	TAAATAA
+	(346, 351)	BAS2	TAATAA
-	(366, 371)	GCN4	TGACTG
+	(395, 401)	BAS2	TAAATAA
-	(404, 410)	TBP	TATATAT
+	(405, 411)	TBP	TATATAA
+	(430, 435)	GCN4	TGAGTT

SerRScyt

>GACATGCCTTAGAATTGTATCCCAAATAGATTTTTATAAAATATAGATCAATATGCTAAA
TTAGTATGATAAAAGGCATGAAATCTATCAAGTATCATATTCCTGCATATATTTGAAGGTT
TAAATTTTTTCTGTTCACTTGGACGGACGTAATTGAAATATTCTTCATTCGAACAGATA
CAAAGTTCCGTAGACAAAATG

-	(31, 37)	TBP	TATAAAA
+	(34, 40)	TBP	TATAAAA

SerRSmit

>AGGTTGAATCCCTGCATTAATTAATAGTAAGATTATTATAGAGATAGAACACTCTACATA
GTTCTTTGTATTGTATATTATTAACGTTTTGAAATGAACAAGTAAAGTAACTGAATTGTAAT
TGATGTAAATTATTCTATTAACCAACGATGCTCTAACAATTTTATAGCTTAATTCGCAGCG
ATGAAAAATTCGATCATATCGACTTGGATCTTGGATTTTGTTCATCATATACTTTAATG

+	(4, 9)	GCN4	TGAATC
-	(16, 22)	BAS2	TAATTAA
+	(17, 23)	BAS2	TAATTAA
-	(32, 37)	BAS2	TAATAA
+	(77, 83)	AP-1	TTATTAA
-	(77, 82)	BAS2	TAATAA
+	(111, 116)	GCN4	TGAATT
-	(161, 167)	TBP	TATAAAA

tRNA_{CAG}

>TGTTAATAGATAATTGTAATAAATATGATTTTATAAGGCCCTCAACTTAGTGCTAAGTGA
TCTTGTTTTAAATAGTCTTTTTGTTGGCACCCCTTTTTTTTTAGCAATGTGAGATCAAACATT

TTTTGGTGCAATCTACATATAAATGCATAAATTTCTTAAAATGTTTAAATTGCTGCAATTAA
 AGTAATACATAATATGCATTGCTATGTACTTCTTATAAGCCTTCCCAAATTTACCTATTC
 CTTAACGATAATAGTTTAAAGGTTTGAATTGGCATGCCTCCATGTTGCTGCTTTTCTGAAT
 AATTTAGAGGATTTGCATCTGATGCTTACACATTATTACACATTAATAAAAAAAAAAGTAATAA
 TTACAAATAATGCTACATGGTATTTCAACCGAGATCAGCTAGATTTGGATTCTTTTATTTTC
 CCCTAATTAATATAAAAAACTAGTAGATCATTGTATATATATCGAAATATGAGCCTATATA
 CTCTGTTCTTCTCTAAAAGGCCATTAGACG





+	(16, 21)	BAS2	TAATAA
+	(25, 30)	GCN4	TGATTT
-	(28, 34)	TBP	TATAAAA
+	(139, 145)	TBP	TATAAAT
+	(224, 228)	GCR1	CTTCC
+	(269, 274)	GCN4	TGAATT
+	(301, 306)	GCN4	TGAATA
-	(339, 344)	BAS2	TAATAA
+	(361, 366)	BAS2	TAATAA
-	(427, 431)	STRE	AGGGG
+	(431, 437)	BAS2	TAATTAA
-	(435, 445)	ORC	TTTTATATTTA
+	(439, 445)	TBP	TATAAAA
+	(463, 469)	TBP	TATATAT

Anexo 2

[Artículo de investigación publicado](#)

Article

Alternative CUG Codon Usage in the Halotolerant Yeast *Debaryomyces hansenii*: Gene Expression Profiles Provide New Insights into Ambiguous Translation

Daniel Ochoa-Gutiérrez^{1,2}, Anya M. Reyes-Torres¹, Ileana de la Fuente-Colmenares¹,
Viviana Escobar-Sánchez¹ , James González¹ , Rosario Ortiz-Hernández³, Nayeli Torres-Ramírez³ 
and Claudia Segal-Kischinevsky^{1,*} 

¹ Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad # 3000, Cd. Universitaria, Coyoacán, Mexico City 04510, Mexico

² Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad # 3000, Cd. Universitaria, Coyoacán, Mexico City 04510, Mexico

³ Laboratorio de Microscopía Electrónica, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad # 3000, Cd. Universitaria, Coyoacán, Mexico City 04510, Mexico

* Correspondence: claudiasegal@ciencias.unam.mx



Citation: Ochoa-Gutiérrez, D.; Reyes-Torres, A.M.; de la Fuente-Colmenares, I.; Escobar-Sánchez, V.; González, J.; Ortiz-Hernández, R.; Torres-Ramírez, N.; Segal-Kischinevsky, C. Alternative CUG Codon Usage in the Halotolerant Yeast *Debaryomyces hansenii*: Gene Expression Profiles Provide New Insights into Ambiguous Translation. *J. Fungi* **2022**, *8*, 970. <https://doi.org/10.3390/jof8090970>

Academic Editors: Jose Ramos and José Luis Martinez

Received: 24 August 2022

Accepted: 12 September 2022

Published: 16 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* belongs to the CTG-Ser1 clade of fungal species that use the CUG codon to translate as leucine or serine. The ambiguous decoding of the CUG codon is relevant for expanding protein diversity, but little is known about the role of leucine–serine ambiguity in cellular adaptations to extreme environments. Here, we examine sequences and structures of tRNA_{CAG} from the CTG-Ser1 clade yeasts, finding that *D. hansenii* conserves the elements to translate ambiguously. Then, we show that *D. hansenii* has tolerance to conditions of salinity, acidity, alkalinity, and oxidative stress associated with phenotypic and ultrastructural changes. In these conditions, we found differential expression in both the logarithmic and stationary growth phases of tRNA^{Ser}, tRNA^{Leu}, tRNA_{CAG}, LeuRS, and SerRS genes that could be involved in the adaptive process of this yeast. Finally, we compare the proteomic isoelectric points and hydrophathy profiles, detecting that the most important variations among the physicochemical characteristics of *D. hansenii* proteins are in their hydrophobic and hydrophilic interactions with the medium. We propose that the ambiguous translation, i.e., leucylation or serynation, on translation of the CUG-encoded residues, could be linked to adaptation processes in extreme environments.

Keywords: CTG-Ser1 clade; ambiguous translation; CUG codon; mistranslation; serynation; leucylation

1. Introduction

Debaryomyces hansenii is a non-conventional yeast with applications in biotechnology and the food industry due to its ability to grow in extreme environments of osmolarity, salinity, and low temperatures [1–3]. It can be found in shallow sea waters and salty food products within 0.6–4 M of NaCl and can proliferate in the 3–10 pH range. Several studies have focused on characterizing the function of genes that respond to different stress conditions such as salt, pH, and oxidative insults in *D. hansenii* [4–9]. High salinity disturbs the redox homeostasis of the yeast, resulting in oxidative damage by reactive oxygen species (ROS), as their accumulation triggers a condition called oxidative stress [10]. The activity of superoxide dismutases, catalases, peroxidases, and thioredoxin plays a central role in the decomposition of intracellular ROS that accumulate because of ATP synthesis during cellular respiration [6–8,11]. Under oxidative stress conditions, H₂O₂ removal is crucial to preventing oxidative damage caused by ROS [10,12].

In *D. hansenii*, intracellular buffer capacity and the plasma membrane ATPase protein activity have been ruled out as possible mechanisms underlying the different abilities to maintain cellular homeostasis during acidic and alkaline pH stress [13]. Gene expression patterns at high pH and salinity analyzed by microarrays revealed the downregulation of genes related to energy production pathways, cell cycles, and DNA transcription [9].

The genetic code has been considered universal and immutable; however, codon ambiguity in protein synthesis is a common process in nature, and several organisms load non-cognate amino acids, an advantageous condition for adaptation to different environments [14]. During protein synthesis, there are several points at which codon ambiguity may occur, not necessarily involving mistakes in error-correcting mechanisms, and moreover, it can improve the survival of organisms by expanding protein diversity [15–17]. Mistranslation has been described in bacterial, archaeal, and eukarya domains as a stress response to low temperature, the presence of toxic agents, and acidic pH [18–22].

D. hansenii belongs to the CTG-Ser1 clade, which ambiguously translates CUG codons as leucine (3%) or serine (97%) [23–25]. CUG ambiguity confers a hypothetical proteome increased by each CUG codon, expanding phenotypic variability and cellular adaptations to face different environments [3]. In the human pathogenic yeast *Candida albicans*, the tRNA^{Leu} with CAG anticodon is a hybrid that can be recognized and loaded by both seryl-tRNA synthetase (SerRS) and leucyl-tRNA synthetase (LeuRS), resulting in tRNA_{CAG} serylation and leucylation. When *C. albicans* grows in the presence of human leukocytes, the proportion of leucine charged on positions codified by CUG codons fluctuates between 7% and 0.5%. In this way, proteome diversity appears to enhance phenotypic assortment to cope with the human immune response and improve yeast infection [26,27]. Moreover, the manipulation of CUG mistranslation in *C. albicans*, up to 28% leucine incorporation in CUG decoding, triggers the expression of virulence factors such as cell adhesion, phenotypic switching, morphogenesis, and extracellular hydrolase production [26].

The *C. albicans* SerRScyt and LeuRScyt structures have been reported, and sequence features that allow the binding of these proteins to tRNA_{CAG} were found. Both *C. albicans* SerRScyt and LeuRScyt have the same affinity for loading their corresponding amino acids in vitro; however, in vivo, there is a significant preference of SerRScyt over LeuRScyt for tRNA_{CAG} [28,29]. LeuRScyt from *C. albicans* also exhibits the same affinity and leucylation capacity for both tRNA^{Leu} and tRNA_{CAG} [29], suggesting that there must be another regulatory system for avoiding the 50/50% leucylation–serylation of tRNA_{CAG}.

There are no previous studies of the CUG codon usage in *D. hansenii*; the gene sequences of the tRNA_{CAG} and both aaRS are encoded in its genome, and therefore it might ambiguously translate CUG. To gain insight into the ambiguous codon usage in *D. hansenii*, we evaluated phenotypic variation and gene expression profiles under stress conditions. In this work, we analyzed cell viability, growth rate, colony switchover, and ultrastructure. Differential gene expressions of tRNA_{CAG}, tRNA^{Leu}, tRNA^{Ser}, LeuRS, and SerRS genes were detected during the logarithmic and stationary phases in response to different ranges of NaCl, pH, and H₂O₂. Moreover, we analyzed, in silico, the shifts in the proteomic isoelectric point (pI) and hydropathy profiles of *D. hansenii* when serine or leucine are used to identify some of the potential consequences on the proteome of stress-related codon ambiguity. This is the first study about tRNA_{CAG} and aaRS transcriptional rate linked to CUG codon as a response to stress conditions.

2. Materials and Methods

2.1. In Silico Sequence Analyses

The nucleotide sequences of *D. hansenii* aaRS and tRNAs (*LeuRScyt* ID: 8998907, locus DEHA2F07414p; *LeuRSmit* ID: 2899919, locus DEHA2A05038p; *SerRScyt* ID: 2904476, locus DEHA2G01694p; *SerRSmit* ID: 2904638, locus DEHA2G04972p; tRNA_{CAG} ID: 8998205, locus DEHA2B07766r; tRNA_{CGA}^{Ser} ID: 8998944, locus DEHA2F11264r; and tRNA_{AAG}^{Leu} ID: 8998402, locus DEHA2C16522r) were identified and used for manual primer design (<https://www.thermofisher.com/oligo/calculation>, accessed on 15 January 2020).

Nucleotide sequences of tRNAs from the CTG clade (*M. bicuspidata*1 ID: 30032540, locus METBIDRAFT_t152; *M. bicuspidata*2 ID: 30032539, locus METBIDRAFT_t151; *H. burtonii* ID: 30998607, locus HYPBUDRAFT_t106; *C. tropicalis* ID: D17535.1; *C. dubliniensis* ID: 8048316, locus tRNA-Ser (CAG); *C. albicans* ID: 30515292, locus tS(CAG)1; *S. tansawaensis* ID: 30986355, locus CANTADRAFT_t43; *C. parapsilosis* ID: 59387608, locus CPAR2_t_cp_Ser(CAG)_61; *B. inositovora*1 ID: 30151225, locus BABINDRAFT_t382, and *B. inositovora*2 ID: 30150929, locus BABINDRAFT_t115; *C. maltosa* ID: D26074.1) were aligned with Clustal Omega and edited using MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> accessed on 4 February 2020).

Codon usage data were obtained from the Sequence Manipulation Suite (SMS, https://www.bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html, accessed on 4 February 2020) and the Kazusa Codon Usage Database (<https://www.kazusa.or.jp/codon/> accessed on 28 February 2020).

2.2. Culture Media

Wild-type *D. hansenii* Y7426 strain was grown and preserved in 0.6 M NaCl-YPD (1% *w/v* yeast extract, 2% *w/v* peptone, 2% *w/v* glucose and 0.6 M NaCl) with 2% *w/v* agar. *D. hansenii* was pre-grown overnight (16 h) in the basal medium 0.6 M NaCl-YPD, pH 6.5, at 28 °C, with continuous shaking (180 rpm). Sodium chloride in different concentrations (0.6, 1.2, 1.8, 2.4, and 3 M) was added to the cultures when indicated. HCl or NaOH 1 M were used to adjust the pH to 3.5, 4.5, 6.5, 8.5, or 9.5. To perform H₂O₂ shock, cultures were exposed for one hour to 30 mM H₂O₂. For colony morphotype determination, serial dilutions were spotted in agar plates adjusted with the different conditions and registered using a stereoscopic microscope (Carl Zeiss Stemi DV4, Carl Zeiss Light Microscopy, Göttingen, Germany) at 32X magnification after 72 h.

2.3. Transmission Electron Microscopy

Samples were prepared according to Wright [30]. Briefly, *D. hansenii* colonies were immersed in prefixation solution (0.2 M PIPES pH 6.8, 0.2 sorbitol, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 4% glutaraldehyde) overnight at 4 °C. Next, cells were spun down at 1500× *g* for 5 min, and the pellet was rinsed with water. Cells were post-fixed in 2% potassium permanganate for 45 min. Samples were contrasted with 1% uranyl acetate, dehydrated in graded ethanol series 25–100%, and processed for epoxy embedding. Ultrathin sections of 60 nm were cut using the ultramicrotome Leica Ultracut UCT, mounted on copper grids covered with formvar, and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Sections were observed under a Jeol 1010 electron microscope at 80 kV. Digital images were captured with a Hamamatsu camera (Hamamatsu Photonics K. K., Hamamatsu City, Japan).

2.4. Growth Curves

Cell growth was monitored by measuring optical density at 600 nm (OD). Each growth curve was performed by triplicate. Cultures in the corresponding growth media were inoculated at 0.05 OD with water-washed cells from the pre-culture and incubated for at least 80 h.

2.5. RNA Extraction and cDNA Synthesis

Total RNA was extracted following a modified RNA extraction method for *S. cerevisiae* [31] from 50 mL cultures in the selected medium. Exponential growth phase samples (1.0 OD) were collected after 15 h of continuous culture in YPD, 0.6 M NaCl, and 30 mM H₂O₂ shock, 25 h in pH 3.5 and 8.5, and 48 h in 2.4 M NaCl. Stationary growth phase samples were collected after 56 h in YPD and 0.6 M NaCl, 48 h in pH 3.5, 8.5, and 30 mM H₂O₂ shock, and 90 h in 2.4 M NaCl.

Cells were harvested by centrifugation and resuspended in 600 µL of AE buffer (50 mM sodium acetate, 10 mM EDTA). Resuspended cells were transferred to a 2 mL microcentrifuge tube with 450 µL of glass microbeads (425–600 µm), 450 µL of pH 4.5 phenol, and 40 µL of 10% SDS and mixed by vortexing. The mixture was incubated for 5 min at 65 °C and

vortexed for 30 s twice. The suspension was then rapidly chilled at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 min and then centrifuged for 5 min at maximum speed to separate the aqueous and phenol phases. The upper, aqueous phase was transferred to a fresh microcentrifuge tube and extracted with one volume of pH 4.5 phenol/chloroform/isoamyl alcohol 25:24:1 twice. Then, the aqueous phase was extracted one last time with one volume of chloroform/isoamyl alcohol 24:1. To precipitate RNA from the aqueous phase, 1/10 volume of 0.3 M sodium acetate, pH 5.3, and 2.5 volumes of chilled absolute ethanol were added. The mixture was incubated for 60 min at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ and centrifuged for 15 min at $16,000\times g$. The supernatant was discarded, the pellet was washed with 75 % ethanol, air-dried, and finally resuspended in 25 μL of sterile RNase-free water. After quantifying 260/280 and 260/230 ratios by spectrophotometry and verifying integrity on a denaturing formaldehyde agarose gel, 2 μg of total RNA were digested with DNase I (Promega, Madison, WI, USA) to remove any contaminating genomic DNA. Next, cDNA synthesis reactions were performed using the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) following the supplier's recommendations for using a random hexamer primer.

2.6. RT-qPCR

Amplification and detection of cDNA by PCR were performed with SYBR FAST qPCR Kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA), using 1 μL cDNA per 10 μL reaction using primers P1-P2, P3-P4, P5-P6, P7-P8, P9-P10, P11-P12, P13-P14 respectively (Table S1), and verified by gel electrophoresis. Quantification was performed with Rotor Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany) using Q-Rex software (Qiagen). Profile settings were initial denaturation at $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min and 40 cycles of denaturation at $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 s, annealing at $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 s, amplification and detection at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 s. The $\log_2 \Delta\Delta\text{C}_q$ was used to construct a heatmap using the *DhRPS3* gene as a reference gene since its expression is stable under the stress conditions tested (Figure S1). Triplicates were performed for each treatment-group and 0.6 M NaCl-YPD was used as a no-stress basal condition. Significance analysis was obtained by a two-way ANOVA (Figure S2).

2.7. Proteomic Physicochemical Properties

Protein isoelectric points (pI) of *D. hansenii*, *C. albicans*, and *S. cerevisiae* proteomes were retrieved from Isoelectric Point DataBase (<https://isoelectricpointdb.org/>, accessed on 15 July 2021). The pI value of *D. hansenii* and *C. albicans* proteins was computed as 5.68 for Serine and 5.98 for Leucine for each CUG codon.

The proteomic pI profiles were compared, and six group ranges were chosen, three on valleys (5.3–5.9, 7–8.9, and 10.1–13) and three on peaks (4.2–5.2, 6–6.9, and 9–10.1), and a variance analysis using ANOVA was performed.

Hydropathy scores were calculated by adding the hydropathy value of each amino acid in every protein using three different hydropathy scales [32–34]. Gene annotation was tracked using Gene Ontology AmiGO (AmiGO 2, <http://amigo.geneontology.org/amigo>, accessed on 8 August 2022). A total of 6268 *D. hansenii*, 6030 *C. albicans*, and 6002 *S. cerevisiae* genes were processed.

3. Results

3.1. Sequence and Structure Conservation of tRNA_{CAG} among CTG-Ser1 Clade

Translation ambiguity of the CTG-Ser1 clade has been mainly studied in *C. albicans*; therefore, we analyzed the tRNA_{CAG} genes from sequenced clade species, as described in materials and methods, to identify any conservation of the features involved in CUG codon ambiguity (Figure 1A). The structure of the tRNA_{CAG} of *C. albicans* has three unusual properties: (i) it has one guanosine (G) at position 33 adjacent to the CAG anticodon, (ii) the GGG-CCC structure on the T ψ C arm has both LeuRS and SerRS recognition elements, and (iii) tRNA_{CAG} possess a discriminatory G at position 73 recognized by SerRS to load Serine into the 3' of the tRNA [27,35,36].

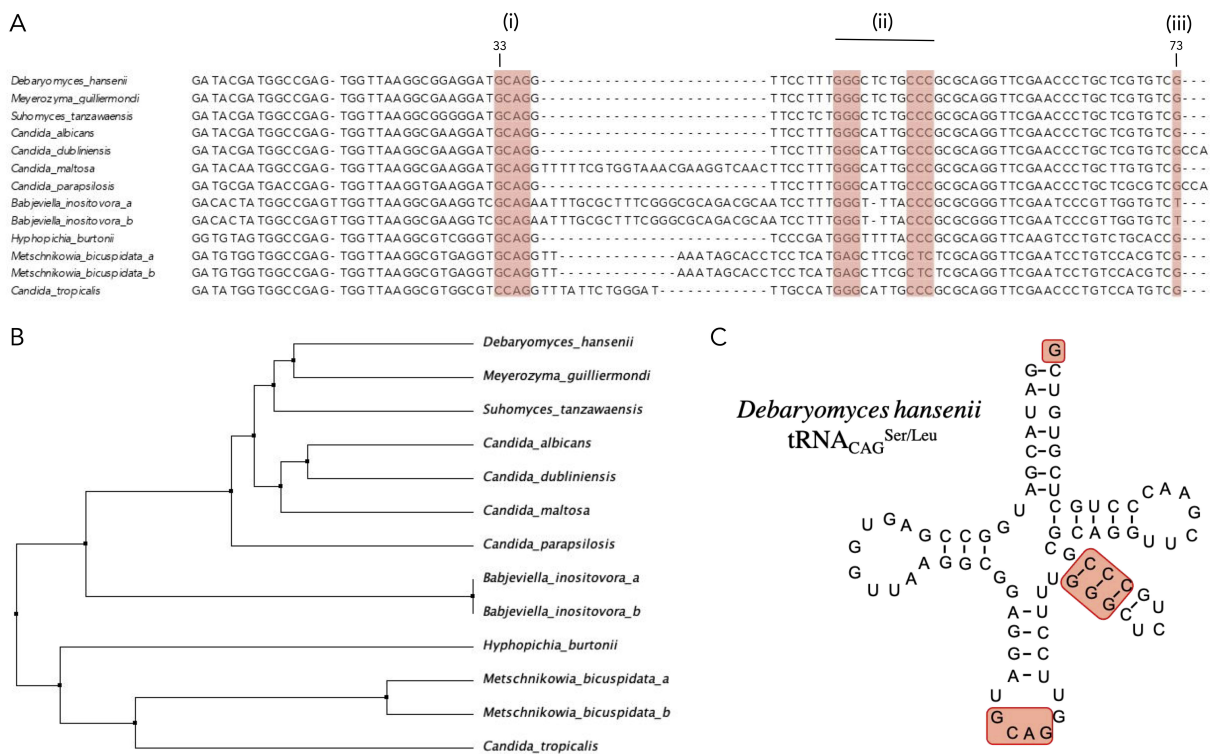


Figure 1. Sequence and structure analysis of tRNA_{CAG} from the fungal CTG-Ser1 clade. (A) Multiple alignment of tRNA_{CAG} genes from fully sequenced genomes of the CTG-Ser1 clade. Red squares highlight regions for LeuRS and SerRS recognition (i, ii, iii). (B) Neighbor-Joining tree reconstructed using tRNA_{CAG} sequences of the CTG-Ser1 clade. (C) Secondary structure of *D. hansenii* tRNA_{CAG} with LeuRS and SerRS recognition elements highlighted.

One of the main conserved nucleotides in most tRNAs is a uridine (U) adjacent to the anticodon; a U at this position generates a loop in the anticodon arm that exposes the region and facilitates codon–anticodon interaction [37]. A G base at position 33, feature (i), in the anticodon loop distorts the anticodon arm, resulting in reduced specificity [35,38]. This feature is shared by all the CTG-Ser1 clade yeasts except *Candida tropicalis*. The second characteristic is the CCC-GGG region of the TψC arm, which is conserved except for *Metschnikowia bicuspidata*. At last, the discriminatory G, feature (iii), is present in all the CTG-Ser1 clade species except for *Babjeviella inositovora*.

The phylogenetic tree (Figure 1B) shows that *D. hansenii* groups next to *Candida* spp. and *Meyerozyma guilliermondii* and *Suhoomyces tansawanensis*; therefore, we expect that this group maintains codon ambiguity as has been experimentally observed in *C. albicans*. Another two groups are formed by *B. inositovora* and further by *M. bicuspidata* and *C. tropicalis*, as expected from the alignment and the lack of conservation of the recognition features. All this indicates that although some species may not have leucine–serine ambiguity, all of them could have non-canonical translation to serine, except *C. tropicalis*.

The tRNA_{CAG} of *D. hansenii* (Figure 1C) shares 96% identity to that of *C. albicans*, suggesting that *D. hansenii* tRNA_{CAG} could be recognized by SerRS and LeuRS. Both tRNA_{CAG} secondary structures are highly similar and conserve all recognition elements.

3.2. NaCl, pH and H₂O₂ Stresses Impact Colony Phenotype and Growth Rate in *D. hansenii*

Stress-induced leucylation or serynation of CUG codons could contribute to the maintenance of adaptive capacity in CTG-Ser1 members. Since *D. hansenii* can inhabit extreme environments of salinity, acidity, alkalinity, and others, we studied its growth capacity, tolerance, and survival in different stress conditions, growing cells in rich media (YPD) with different ranges of NaCl, pH, and H₂O₂ as described in material and methods.

Colony morphotypes under different stress conditions are shown in Figure 2A. *D. hansenii* colonies in standard conditions (YPD 0.6 M NaCl, pH 6.5) are round, opaque, and occasionally bright, with rough borders. Without NaCl, colonies are completely opaque, while brightness increases and colonies turn smaller with more defined borders as the salt concentration rises. As the pH decreases, both borders and surface rugosity become exacerbated, while as pH increases, colonies turn less opaque and with rounded borders and a smaller diameter.

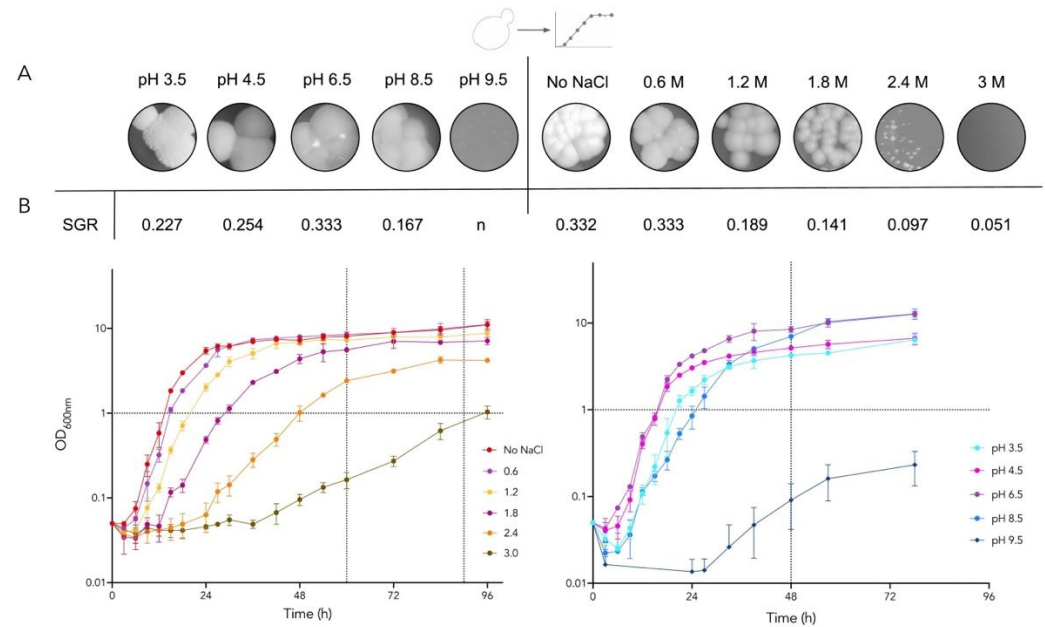


Figure 2. Colony morphology, velocity rate, and growth curves of *D. hansenii* under salinity and pH stress conditions. (A) Colony morphology after 72 h growing on solid media. (B) SGR and growth curves. NaCl concentration left and pH variation right. Dotted lines: RNA RT-qPCR sampling. *n* = no growth.

The specific growth rate (SGR) at the logarithmic phase was calculated, and we observed that as salt concentration increases, SGR decreases exponentially. Meanwhile, SGR is reduced when pH is acidic or alkaline. *D. hansenii* growth dynamics were followed for up to 96 h in different NaCl concentrations and different pH (Figure 2B). Stress conditions were defined as those that affected growth rate but allowed proliferation above 1.0 OD: the stress conditions of 2.4 M NaCl, pH 3.5, and pH 8.5 were chosen to determine tRNA_{CAG} and aaRS expression during the logarithmic and stationary phases. The condition without salt was also selected since *D. hansenii* is euryhaline and it grows optimally between 0.5–1 M NaCl [3,7]. Additionally, one oxidative stress condition was evaluated, 30 mM H₂O₂ shock for one hour since it decreases culture viability by 50% [39].

3.3. *D. hansenii* Culture under Different Stress Conditions Induces Ultrastructure Modifications

The ultrastructural features of the yeasts grown under different stress conditions were analyzed by transmission electron microscopy, TEM (Figure 3). Cells grown under standard conditions (A–D) had mitochondria of typical morphology, with intact outer and inner membranes, as well as the cristae (B). A vacuole exhibiting mainly granular-appearing contents is shown in detail (C). Accumulation of reserve carbohydrates in the cytosol near the mitochondrion was also observed. The cell wall and plasma membrane were found to be completely bound (D).

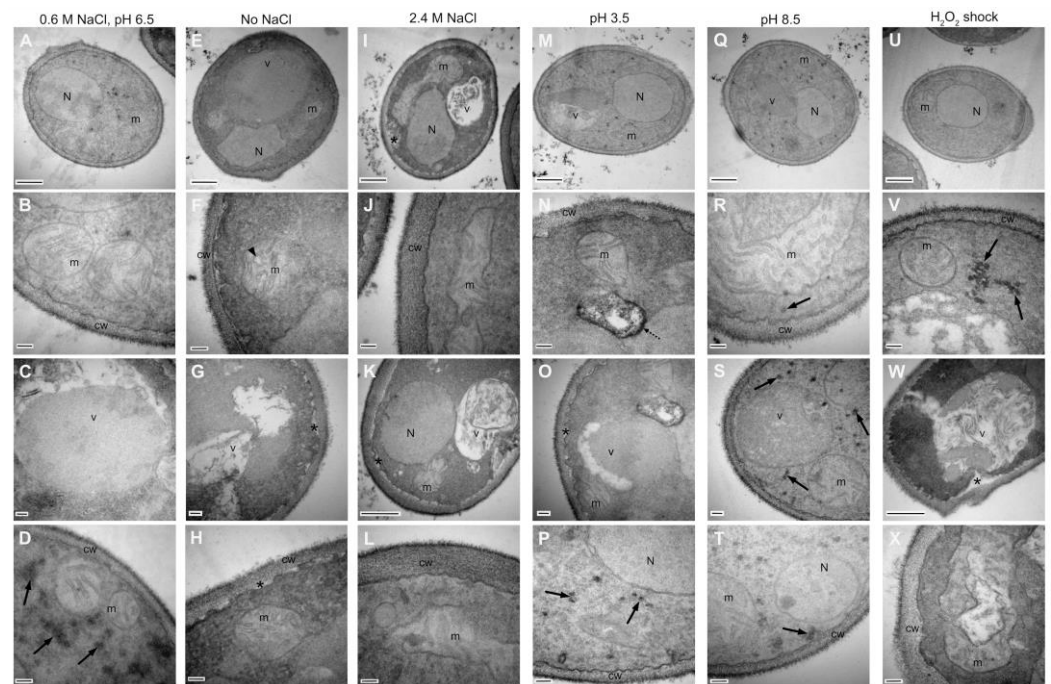


Figure 3. Ultrastructural changes of *Debaryomyces hansenii* by TEM. Micrographs of cells exposed to standard condition (A–D) no salt, (E–H) hypersalinity, (I–L) acidity, (M–P) alkalinity, (Q–T) and an oxidative shock (U–X). Upper row: panoramic view, 500 nm bar; second row: mitochondria detail, 100 nm bar; third row: vacuole detail, 100 nm bar (C,G,O,S) and 500 nm bar (K,W); bottom row: cell wall detail, 100 nm bar. N, nuclei; m, mitochondria; v, vacuole; cw, cell wall. Black arrows (D,P,R,S,T,V), carbohydrates cumulus; arrowhead (F), mitochondrial cristae; discontinuous arrow (N), electron-dense zone; asterisk (G,H,I,K,O,W) plasmatic membrane and cell wall discontinuity.

Vacuole and mitochondria morphology were strongly affected by salinity modifications (E–L), pH variations (M–T), and oxidative stress (U–X), but quite notably, the nucleus maintained its integrity under all conditions.

Cells grown in a culture medium without NaCl (E–H) showed mitochondria with altered morphology and irregular cristae. The vacuoles had an irregular appearance and fibrillar content. In addition, regions with lost membrane/cell-wall interactions were found. No cytosolic accumulation of reserve carbohydrates was observed.

Under hypersalinity conditions (I–L), elongated mitochondria were recognized, suggesting the fusion of this organelle. Likewise, regions with a loss of interactions were spotted between the plasma membrane and the cell wall. The cytosolic accumulation of reserve carbohydrates was also not observed in this condition.

The growth of *D. hansenii* in an acidic medium (M–P) also induces changes in mitochondria morphology; the vacuole presents granular content with electron-dense and empty zones. Regions where the interactions between the plasma membrane and the cell wall were completely lost can be distinguished. At alkaline pH (Q–T), elongated mitochondria with extended cristae are visible, and the vacuoles present granular content. In addition, in both acidic and alkaline pH, the presence of reserve carbohydrate clusters was maintained.

Exposure to an oxidizing environment (U–X) did not generate changes in the mitochondrial spherical morphology, but important structural alterations were recognized in the cristae that were poorly defined and irregular with empty areas. Inside the vacuoles, contents of heterogeneous appearance can be seen, ranging from granular to fibrillar with a concentric arrangement, in which the edges extend to the plasma membrane without a clear boundary. Interestingly, the separation between the plasma membrane and the cell wall is exacerbated and shows clusters of reserve carbohydrates close to the mitochondria.

Cell wall thickness increases markedly under 2.4 M NaCl and H₂O₂ conditions, which is a hallmark of the stress response in many fungi, as cell wall morphology and integrity

constitute the first line of defense against harsh environments. Cell wall thickening is directly correlated with loss of permeability under environmental stress conditions such as high osmolarity or oxidative stress, resulting in increased resistance to pro-oxidant or harmful compounds by limiting their diffusion into the cell [40–42].

3.4. Stress Induces Differential Gene Expression of Ambiguous Translation-Related Genes

We evaluated differential gene expression of tRNA_{CAG} and LeuRS and SerRS genes in cultures after growth in stress conditions selected above and without NaCl. *D. hansenii* codes for one tRNA_{CAG}; two SerRS–SerRScyt and SerRSmit; and two LeuRS–LeuRScyt and LeuRSmit. We also selected two single copy tRNAs, tRNA^{Leu} and tRNA^{Ser}, with the lowest usage frequency to compare their expressions (Figure 4 and Figure S2).

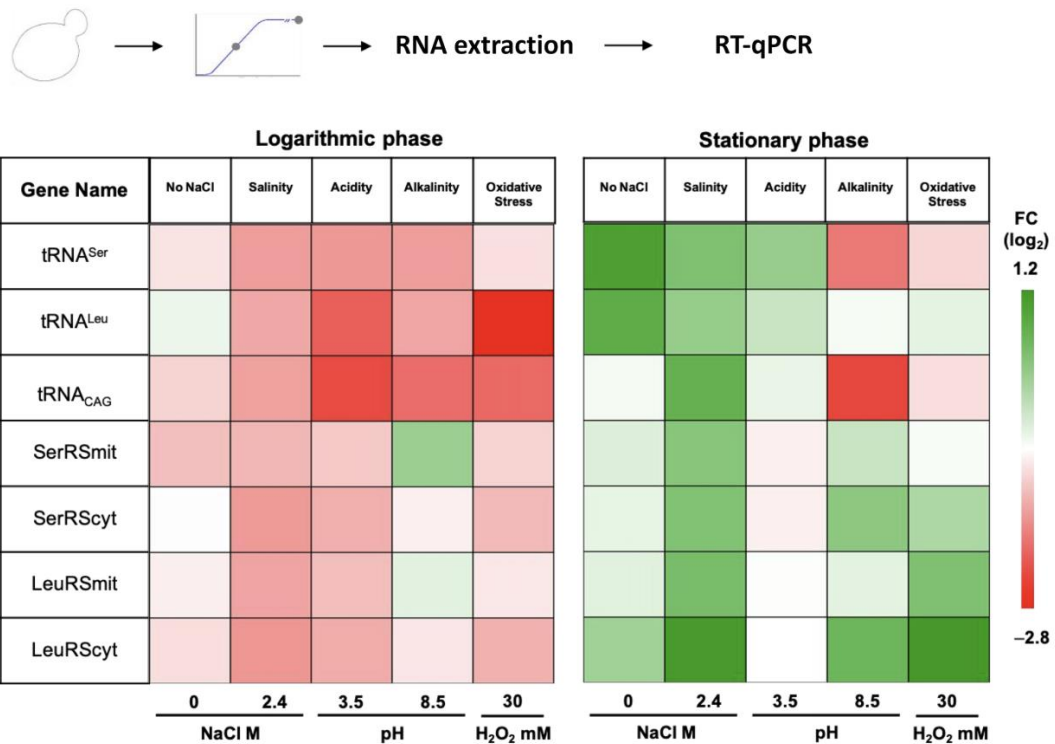


Figure 4. Heatmap of RT-qPCR analysis of *D. hansenii* ambiguous translation-related genes under different stress conditions. RT-qPCR was performed on cDNA using gene-specific primers for tRNA^{Ser}, tRNA^{Leu}, tRNA_{CAG}, and different aaRS of *D. hansenii*. Cells were cultivated in salinity, acidity, alkalinity, and H₂O₂ shock during the logarithmic and stationary growth phases. The first two columns denote the gene names, while the rest indicate No NaCl and stress conditions. The fold change $-\log_2$ is color coded (red, lower abundance; green, higher abundance).

During the logarithmic growth phase, the tRNA_{CAG} is underexpressed in all conditions compared with the control. The lowest expression occurs in acidity, being two times lower than in the standard condition. In the stationary growth phase, the differences occur at 2.4 M NaCl, when the expression rises once, and in alkalinity, when expression is 1.5 times lower.

The two pairs of paralogous genes—LeuRScyt vs. LeuRSmit and SerRScyt—vs. SerRSmit, showed differential expression. During the logarithmic growth phase, both LeuRS were downregulated in 2.4 M NaCl and pH 3.5, but only LeuRScyt was underexpressed in alkalinity. In the stationary growth phase, the expressions of both LeuRS increased at 2.4 M NaCl and H₂O₂ shock; at pH 8.5, only LeuRScyt was overexpressed but in the opposite direction of the logarithmic growth phase. Both SerRS were downregulated during the logarithmic growth phase in medium with 2.4 M NaCl, pH 3.5, and oxidative shock. Differential SerRS expression was observed in that only SerRSmit was downregulated without NaCl and upregulated in alkalinity. At the stationary growth

phase, both SerRS expressions in the 2.4 M NaCl condition were higher than basal. At pH 8.5, SerRScyt was overexpressed more than SerRSmit, whereas in oxidative shock, SerRScyt was overexpressed, and SerRSmit expression remained constant.

Afterwards, we performed an integral gene expression analysis in order to identify changes in the probability of the leucylation or serynation of the tRNA_{CAG}, which in turn depended on the concentration balance of the seven molecules involved in this process.

We first compared tRNAs expression levels, which are equivalent to their concentrations in the cell. During the logarithmic growth phase, in pH 3.5, tRNA_{CAG} and tRNA^{Leu} were downregulated when compared with tRNA^{Ser}. In H₂O₂ shock, the expression was two times lower for the tRNA_{CAG} and almost three times lower for the tRNA^{Leu}. In the stationary growth phase, the tRNA^{Ser} and tRNA^{Leu} genes were overexpressed without NaCl, while tRNA_{CAG} expression remained steady. With 2.4 M NaCl, tRNA_{CAG} showed an increase, in contrast to tRNA^{Leu} and tRNA^{Ser}. The most evident expression difference between tRNAs was observed in alkalinity, where tRNA^{Ser} and tRNA_{CAG} were expressed two and almost three times less than the tRNA^{Leu}, respectively.

Then, we compared the aaRS expression assuming that it would be proportional to the final protein concentration. The SerRSmyt gene was overexpressed at pH 8.5, while the other three aaRS were expressed at similar levels to the reference condition during the logarithmic growth phase. On the other hand, in the stationary growth phase, LeuRScyt was overexpressed without NaCl, 2.4 M NaCl, pH 8.5, and H₂O₂ shock at least one-fold compared with the other aaRS genes.

Despite the individual expression differences we found, there was an overall tendency to downregulation during the logarithmic growth phase, in contrast to the upregulation observed in the stationary phase. This suggests that the proportion of leucylation or serynation in *D. hansenii*'s proteome might be readjusted when another stress factor, like nutrient depletion including leucine and serine availability, is added.

3.5. Codon Ambiguity Changes the Physicochemical Properties of Proteins to a Higher Extent in *D. hansenii* than in *C. albicans*

Ambiguous translation can affect 4110 *D. hansenii* genes since nearly 66% of its 6272 annotated genes have at least one CUG codon. Most *D. hansenii* genes—1411—have only one CUG codon in their sequence, whereas 31 CUG codons is the maximum number found in a gene. For each CUG codon, there could be two possible protein isoforms, increasing phenotypic plasticity. There are two hypotheses regarding the number of protein molecules that can be produced from *D. hansenii* genes considering the loading of serine or leucine at each of these CUG positions: 2^n or $2(n)$, where n is the number of CUG contained in a gene [27,28]. The first hypothesis considers unregulated random charging of the CUG codon; therefore, the *D. hansenii* genome would have the capacity to synthesize more than 3.1×10^9 different proteins. The other hypothesis contemplates a more restricted and regulated CUG codon charging only serine or only leucine in each protein, resulting in the synthesis of up to 10,382 different polypeptides.

To explore the effects of CUG ambiguity at the proteomic level, we analyzed the physicochemical properties of *D. hansenii* proteins with CUG-encoded residues that were translated restrictively with either serine or leucine in silico. The structure, stability, solubility, and function of proteins depend on the electrostatic properties of the side chains of the individual residues. The isoelectric point of proteins is mostly influenced by the ionization state of seven amino acids arginine, aspartate, cysteine, glutamate, histidine, lysine and tyrosine, in addition to the charges of the terminal groups -NH₂ and -COOH [43]. Neither leucine nor serine side chains are charged; however, their physicochemical properties are quite different: Leucine is hydrophobic, and serine is polar. As an approach to quantifying the influence of the incorporation of serine in place of leucine on the pI, 0.3 units were subtracted for each CUG-encoded leucine. An isoelectric point shift analysis was performed to identify differences between the use of one or the other amino acid in the sequence (Figure 5A). Only 16 *D. hansenii* gene products changed their pI by at least

0.1 difference from the original all-serine translated protein, and just seven have known functions according to Gene Ontology (Tables S3 and S4). Interestingly, for *C. albicans*, all 6438 proteins maintained their pI.

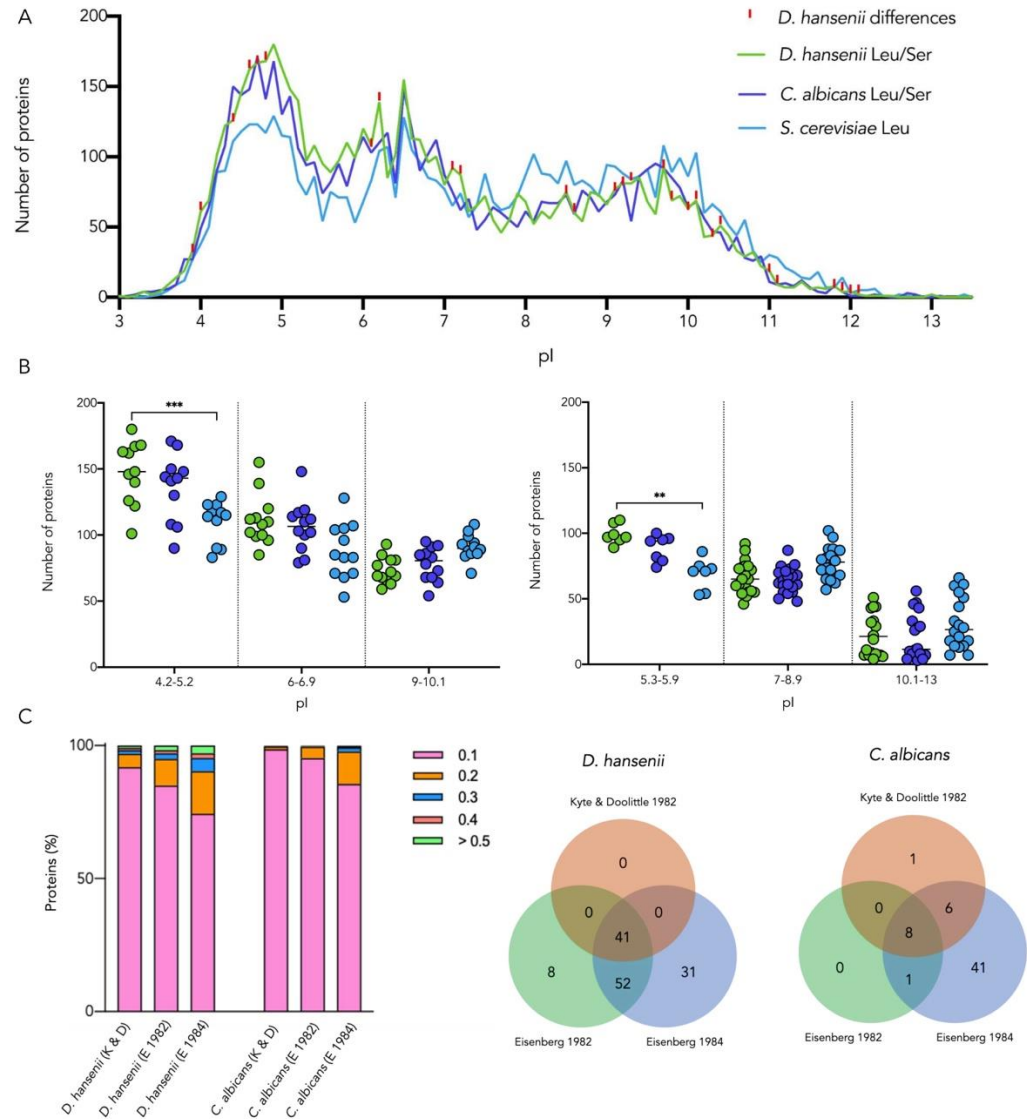


Figure 5. Comparative analysis of proteomic isoelectric point and hydrophobicity profiles. (A) Isoelectric point profiles of *D. hansenii* (green) and *C. albicans* (purple) proteins translated with serine or leucine compared with the pI profile of *S. cerevisiae* (blue). *C. albicans* has the same pattern using either serine or leucine. Substantial pI differences between *D. hansenii* serine or leucine profiles are highlighted in red. (B) Number of proteins in peaks and valleys for the three organisms in various pH ranges. Significant differences: 0.01 (**) and 0.001 (***). (C) Hydrophobicity shift of *D. hansenii* and *C. albicans* proteins with CUG-encoded residues using three hydrophobicity scales: Kyte and Doolittle [32], Eisenberg [33], and Eisenberg [34]. Colored bars indicate the percentage of proteins with hydrophobicity variation if leucine was incorporated instead of serine (left). The Venn diagrams show coincidences and differences in the number of proteins with the largest shifts applying each hydrophobicity scale, ≥ 0.03 for the first scale and ≥ 0.3 for the two Eisenberg scales (right).

Comparing the overall isoelectric point pattern, we observe that *D. hansenii* and *C. albicans* proteomes are markedly more acidic than that of *S. cerevisiae*, a well-known characteristic of extremophiles, including halotolerant organisms [44,45]. Proteins from representative peaks and valleys were grouped for each organism, and then the abundance

of proteins in each pI group was compared. Significant differences were found between *D. hansenii* and *S. cerevisiae* in the pI peak 4.2–5.2 and in the pI valley 5.3–5.9 (Figure 5B).

Another important protein feature is hydropathy. In extremophilic organisms and particularly in halophiles, it has been suggested that adaptation to high NaCl concentrations is achieved using different mechanisms: the sterol–phospholipid ratio in the cell membrane [46], compatible osmolyte concentrations as ions and carbohydrates [47], and the activity of some organelles such as vacuoles [48]. However, the interactions of proteins and the actual contributions of all these elements remain unclear.

The proteins of mesophilic organisms are inactivated if exposed to high salt concentrations when these organisms lose ionic balance [49]. In halophiles, polypeptides can establish more hydrophobic interactions that could prevent misfolding, and it has been suggested that there is a direct correlation between hydrophobicity and the net charge of the peripheral amino acid side chains [28].

The hydropathy of *D. hansenii* and *C. albicans* proteomes was calculated using Kyte and Doolittle and two Eisenberg scales [32–34]; differences were tracked when serine was substituted by leucine among proteins with CUG-encoded residues. For each scale, we identified for *D. hansenii* and *C. albicans*, respectively: 1342 and 1088; 2013 and 1801; and 2654 and 2542 proteins with hydropathy variation. Disregarding the hydropathy scale, a large proportion of *D. hansenii* proteome showed more hydropathy modifications than *C. albicans*, and most proteins in both proteomes presented slight changes of 0.1. Only 8 *C. albicans* proteins with high hydropathy alteration (≥ 0.03 for Kyte & Doolittle and ≥ 0.3 for the two Eisenberg scales) were common for the 3 scales, but notably, 41 *D. hansenii* proteins concurred (Figure 5C). The ontology of these 41 proteins was tracked in AmiGO; 8 are related to either mitochondria, translation, ribosome biogenesis, or transport, but 33 have unknown function (Table S4). According to the NCBI RefSeq Database, 23 out of the 33 hypothetical CDs show some extent of similarity to other ascomycete-characterized proteins. By encoding more proteins with larger hydropathy variation, *D. hansenii* has potentially higher adaptability to environmental challenges.

4. Discussion

The genetic code is thought to be universal and immutable, however, the ambiguous decoding of several codons can improve the adaptation of organisms to stress conditions by promoting protein diversity and thus phenotypic plasticity [14–17].

The CTG-Ser1 clade is a group of non-conventional yeasts considered to have ambiguity in the CUG codon [23–25]. In this work, the sequence analysis of tRNA_{CAG} genes showed that not all members of the clade conserve the elements to translate ambiguously or can be recognized by LeuRS and SerRS. *D. hansenii*, one of the species belonging to this clade, encodes one tRNA_{CAG} that shares 96% identity with that of *C. albicans* and conserves both the overall secondary structure and the sequence features that allow recognition by the two different aaRS. We predict and explore the influence of *D. hansenii*'s ability to translate CUG codons as serine or leucine on its wide tolerance to environmental conditions.

Phenotypic switching in *C. albicans* is associated with its adaptive potential. Several phenotypic changes, like cell surface with increased hydrophobicity, affect cell adhesion to solid surfaces and flocculation in liquid medium due to proteomic differences resulting from codon ambiguity [26,50]. *D. hansenii* strains also have good adhesion and sliding motility, despite showing slighter ability to form pseudomycelia than *C. albicans* [51]. We studied *D. hansenii* growth in diverse stress conditions—solid/liquid medium with salinity, acidity, alkalinity, or H₂O₂ shock—to identify morphotype switching as an indicator of translation ambiguity induction. The phenotypic variation observed could be related to the increase in hydrophobicity of the cell surface in response to extreme conditions as previously reported [52].

There is a direct relationship between codon ambiguity and the concentrations of aaRS and tRNAs. Imbalance in the tRNA pool can lead aaRS to load a non-canonical amino acid on a certain tRNA, particularly those that are not frequently used [53,54]. Swanson

et al. (1988) described that overexpression of *E. coli* GlnRS results in the aminoacylation of tRNA^{Tyr} with Gln, and this can be prevented by the overexpression of tRNA^{Gln} [55]. In this work, we analyzed the expression levels of aaRS and tRNA_{CAG} involved in CUG codon ambiguity and found that the concentrations of these transcripts varied according to the yeast physiological condition.

The presence of the tRNA_{CAG} transcript in *D. hansenii* is considered an indicator of codon ambiguity. During logarithmic growth, tRNA_{CAG} is underexpressed in all conditions tested, so the yeast might counteract the stress without needing to use this ambiguity as an adaptive mechanism. However, in the stationary growth phase, tRNA_{CAG} was overexpressed, and given this, codon ambiguity could be promoted in this physiological stage. The exception is in pH 8.5, where tRNA_{CAG} expression remained downregulated in both logarithmic and stationary growth phases, indicating that codon ambiguity may not be essential to contending with alkaline stress. Interestingly, tRNA_{CAG} was overexpressed in 2.4 M NaCl, suggesting that in this condition the codon ambiguity is promoted.

The aaRS expression itself is also determinant of aminoacylation since it depends on the concentrations of SerRS and LeuRS, resulting in the distinct probability of serynating or leucylating the tRNA_{CAG} ambiguously. In all growth phases, aaRS_{Cyt} and aaRS_{mit} for the same amino acid were expressed similarly except for pH 8.5 in any growth phase and H₂O₂ in the stationary growth phase. Experimentally, it is unclear which of the two LeuRS and which of the two SerRS isoforms was responsible for the aminoacylation, but as they were equally expressed in most conditions tested, it can be assumed that any of them might load the tRNA.

To further analyze the possibility of tRNAs serynation or leucylation by aaRS, we also considered the expression of other tRNAs for serine and for leucine. The expression of these tRNAs, which have low codon usage in *D. hansenii*, make them suitable as controls of the basal expression of tRNAs for leucine and serine under the stress conditions evaluated. It is notable that the leucine and serine tRNAs also have differential expression in each stress condition. During the stationary growth phase in alkaline and oxidative conditions, tRNA^{Leu} was expressed at similar levels to that in the reference condition, while tRNA^{Ser} and tRNA_{CAG} were expressed in lower proportions, with tRNA_{CAG} likely to be charged with serine since SerRS was not occupied by another tRNA. Similarly, upon a shock with H₂O₂ during the logarithmic growth phase, tRNA^{Ser} was expressed similar to the reference gene, while tRNA^{Leu} was expressed at a lower rate, suggesting that tRNA_{CAG} leucylation is more likely to occur. In acidity, there was a higher expression of tRNA^{Ser} than the other two tRNAs in both growth phases, suggesting a higher probability of leucylation of tRNA_{CAG} by competition with tRNA^{Ser} for SerRS. In the NaCl-free condition in the stationary growth phase, the expression of tRNA^{Ser} and tRNA^{Leu} was significantly higher than that of tRNA_{CAG}, indicating that the latter will be preferentially loaded with serine as in *C. albicans*. In 2.4 M NaCl, in the logarithmic growth phase, all seven genes were downregulated and similarly expressed to basal, indicating that there was no preference for leucylation or serynation in this condition. However, in the stationary growth phase, all genes were overexpressed. Notably, the LeuRS_{cit} and tRNA_{CAG} genes were even more expressed than the other genes evaluated, which suggests that tRNA leucylation is preferred in this situation, where there has been not only a long time of adaptation to salt stress but also nutrient depletion.

We propose a model for the competition of aaRS to load tRNA with serine or leucine based on environmental stress and differential expression of the genes (Figure 6). The tRNA_{CAG}, tRNA^{Ser}, and tRNA^{Leu} genes, as well as the SerRS and LeuRS coding genes, are constantly expressed but in a regulated form. The two SerRS load serine on tRNA^{Ser} and the two LeuRS load leucine on tRNA^{Leu}, while tRNA_{CAG} could be aminoacylated by either SerRS or LeuRS. The occupancy of SerRS active sites with tRNA^{Ser} and that of LeuRS with tRNA^{Leu} established a competition for loading serine or leucine on the tRNA_{CAG}. Under environmental stress, the concentration of each component involved in ambiguity varies, resulting in different proportions of tRNA_{CAG} loaded with serine or leucine, triggering

dissimilar composition of the proteins with CUG-encoded residues, which finally may alter the proteome and cellular structures.

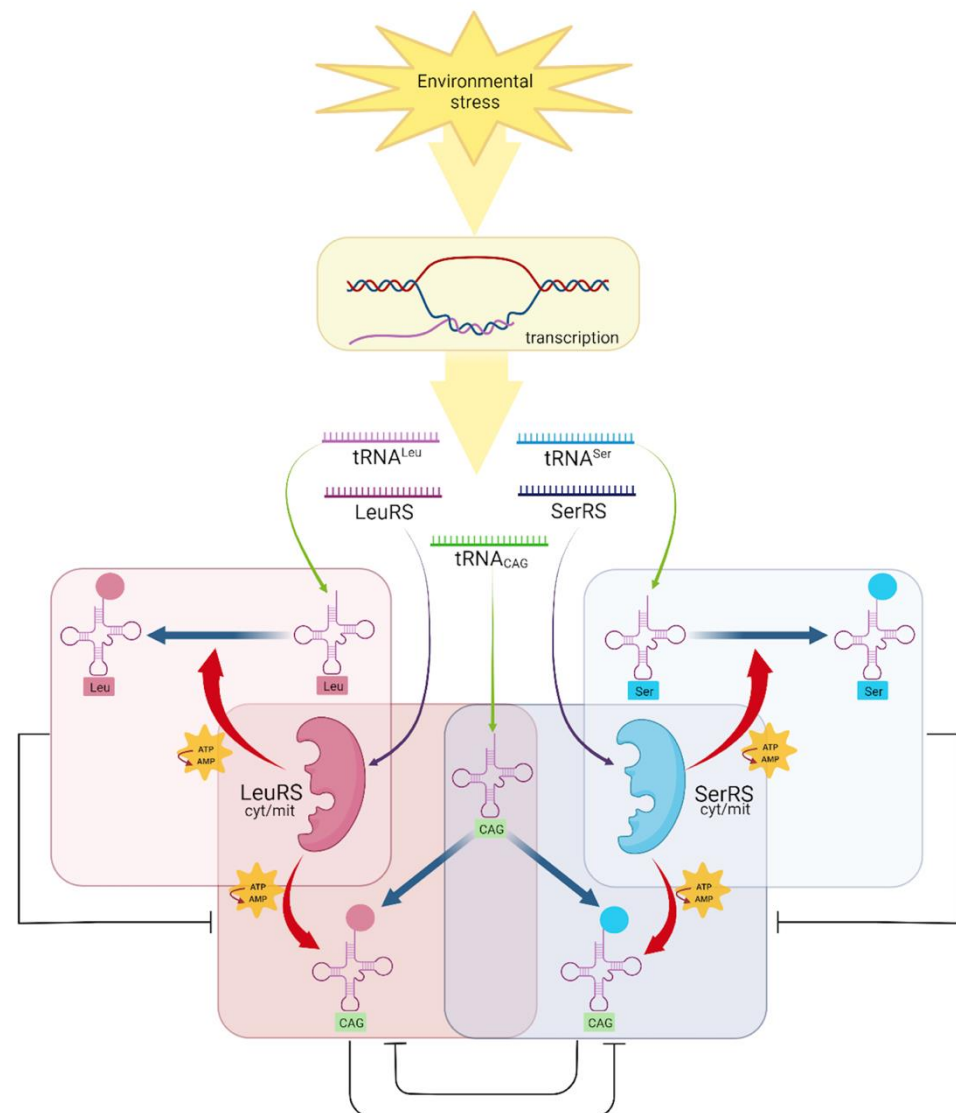


Figure 6. Aminoacylation of tRNA_{CAG} with either serine or leucine. Different stress conditions alter the expression of aaRS and tRNAs. The aaRS transcripts are translated into SerRS proteins and LeuRS proteins (purple arrows). The expression of tRNAs (green arrows) in different proportions, establishes competition for their aminoacylation. Changes in the concentration of tRNA^{Leu} and tRNA^{Ser} alter the proportions of active sites available for loading tRNA_{CAG} with Serine or Leucine (tRNA_{CAG}^{Ser}/tRNA_{CAG}^{Leu}) by aaRS activity (red arrows). An increased concentration of tRNA_{CAG} loaded with either amino acid (blue arrows) could change the proportion of serine and leucine in the *D. hansenii* proteome. Each aminoacylation reaction is enclosed in a colored rectangle, and competition is represented with black inhibition lines considering that the occurrence of one reaction inhibits the other. Created using biorender.com.

The potential ability of the proteomes of the CTG-Ser1 clade to diversify their pI and hydrophathy could be an indication of the extent to which the proteins are affected at the physicochemical level by the incorporation of one or the other amino acid. Serine makes favorable contributions to protein solubility: Trevino et al. [56], reported an increase in solubility by replacing with serine most hydrophobic residues on the protein surface. We identified only 16 proteins that had an altered pI, but 1342, 2013, or 2654 that had a hydrophathy shift according to each scale. This demonstrates that although *D. hansenii*

can live in pH ranges from 3–10, its proteins do not require a pI change to adapt to the environmental challenges that may occur. *C. albicans* did not exhibit any pI variation in any of its proteins. However, the hydropathy values did change substantially in both yeasts, particularly with a higher proportion in *D. hansenii*, indicating that the most important modification among the physicochemical characteristics of proteins from these organisms is in their hydrophobic and hydrophilic interactions with the medium, as was previously proposed [51,57].

Most affected genes of *D. hansenii* are related to transport and mitochondrial function. The variations in colony morphology and cell components reported in this work could be attributed to these proteomic modifications due to the hydropathy switching. Different cell wall proteins interact with membranes through glucans, acting as linker molecules binding different cell wall proteins to the chitin core through glycosyl-phosphatidylinositol proteins. The correct interaction with both lipids and β -1,3-glucan of membrane and cell wall proteins depends on their hydropathy [58]. Vacuolization, granular content, and emptiness in the vacuole are also associated with hydropathy imbalance under stress conditions in yeasts [59]. In the vacuole, sterols and saturated lipids, such as sphingolipids, make clusters and generate membrane domains to which proteins having affinity bind preferentially [60]. In mitochondria, several features are associated with protein hydropathy that allow for the correct formation of cristae and morphological structure. The outer membrane is particularly enriched in phospholipids, whereas the inner membrane has an unusually high protein concentration [61]. Mitochondrial cristae are among the protein-richest membranes of the cell, and half of the hydrophobic volume of the membrane is occupied by proteins. This high degree of proteins is expected to impair the hydrophobic coupling between proteins and lipids unless stabilizing mechanisms are in place [62,63]. Low lipid-to-protein ratios may cause anomalous diffusion, protein clustering, and membrane deformations due to hydrophobic mismatch between the nonpolar core of the lipid bilayer and the nonpolar protein domains [64]. One of the most effective mechanisms of stress reduction in crowded membranes is the aggregation of membrane proteins, which in turn increases hydrophilicity [61]. The outcome of altered protein interactions produced by different ratios of serynation or leucylation in the proteins associated with lipids in these organelles support the observed ultrastructural alterations: discontinuous or ruptured cell-wall membranes, granular empty vacuoles, and mitochondria modifications.

The ability to serynate or leucylate is an extremely complex process and depends not only on the affinity of SerRS and LeuRS for the tRNA_{CAG}, as has previously suggested [28,29], but also on the availability of tRNAs that can be charged by these aaRS and even on the concentrations of other components such as amino acids and translation and transcription factors. In summary, in this work, we found significant variations between the expression profiles of CUG ambiguity genes in conditions of salinity, acidity, alkalinity, and oxidative stress. We suggest that these expression profiles could be correlated to phenotypic changes in *D. hansenii* cells exposed to different stress conditions. More research is needed to expand and update our knowledge about how this mechanism is displayed in *D. hansenii* and other CTG-Ser1 clade members.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof8090970/s1>, Figure S1. Amplification plot showing *DhRPS3* curves in different conditions tested; Figure S2. RT-qPCR analysis by $\Delta\Delta$ CT method. (A) Expression profile in logarithmic growth phase. (B) Expression profile in stationary growth phase. Table S1. Oligonucleotides used in this work; Table S2. *D. hansenii* proteins that change their pI value by at least 0.1 from serine to leucine; Table S3. *D. hansenii* proteins that change their isoelectric point value by at least 0.1 from serine to leucine tracked with AmiGO by Gene Ontology; Table S4. *D. hansenii* proteins with major changes in hydropathy tracked with AmiGO by Gene Ontology.

Author Contributions: Conceptualization, D.O.-G. and C.S.-K.; methodology, D.O.-G., A.M.R.-T., R.O.-H. and N.T.-R.; formal analysis, D.O.-G., A.M.R.-T., I.d.l.F.-C. and J.G.; investigation, D.O.-G., A.M.R.-T. and I.d.l.F.-C.; resources, J.G. and C.S.-K.; data curation, D.O.-G., A.M.R.-T. and I.d.l.F.-C.; writing—original draft preparation, D.O.-G. and C.S.-K.; writing—review and editing, D.O.-G., A.M.R.-T., I.d.l.F.-C., V.E.-S., J.G. and C.S.-K.; visualization, D.O.-G., A.M.R.-T., I.d.l.F.-C., V.E.-S., J.G., R.O.-H., N.T.-R. and C.S.-K.; supervision, J.G. and C.S.-K.; project administration, V.E.-S. and C.S.-K.; funding acquisition, J.G. and C.S.-K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by UNAM-PAPIIT IN225320 and IA208820.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in this manuscript.

Acknowledgments: We thank Lorenzo Segovia and Luis D. Alcaraz for their significant comments on this work and supporting knowledge. We also thank M.S. Andrea V. Cervantes-Ayala for qPCR analysis and Cristóbal A. Hernández-Álvarez for his contribution of yeasts sequence analysis. This work is part of the doctoral thesis of D.O.-G. and is a requirement for obtaining his Ph.D. CONACyT scholarship to D.O.-G. (CVU 554734) and to I.d.l.F.-C. (CVU 620472) and PAPIIME undergraduate scholarship to A.M.R.-T. (PE211619 project). The authors sincerely appreciate the work of the two anonymous reviewers whose suggestions greatly improved our manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Breuer, U.; Harms, H. *Debaryomyces hansenii*—An extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* **2006**, *23*, 415–437. [[CrossRef](#)]
2. Gori, K.; Sørensen, L.; Petersen, M.; Jespersen, L.; Arneborg, N. *Debaryomyces hansenii* strains differ in their production of flavor compounds in a cheese surface model. *Microbiol. Open* **2012**, *1*, 161–168. [[CrossRef](#)]
3. Prista, C.; Michán, C.; Miranda, I.; Ramos, J. The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast* **2016**, *33*, 523–533. [[CrossRef](#)]
4. Prista, C.; González-Hernández, J.C.; Ramos, J.; Loureiro-Dias, M.C. Cloning and characterization of two K⁺ transporters of *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology* **2007**, *153*, 3034–3043. [[CrossRef](#)]
5. Gonzalez, N.A.; Vázquez, A.; Ortiz Zuazaga, H.G.; Sen, A.; Olvera, H.L.; Peña de Ortiz, S.; Govind, N.S. Genome-wide expression profiling of the osmoadaptation response of *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **2009**, *2*, 111–124. [[CrossRef](#)]
6. Navarrete, C.; Siles, A.; Martínez, J.L.; Calero, F.; Ramos, J. Oxidative stress sensitivity in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.* **2009**, *4*, 582–590. [[CrossRef](#)]
7. Segal-Kischinevzky, C.; Rodarte-Murguía, B.; Valdés-López, V.; Mendoza-Hernández, G.; González, A.; Alba-Lois, L. The euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii* has two catalase genes encoding enzymes with differential activity profile. *Curr. Microbiol.* **2011**, *3*, 933–943. [[CrossRef](#)]
8. Ramos-Moreno, L.; Ramos, J.; Michán, C. Overlapping responses between salt and oxidative stress in *Debaryomyces hansenii*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *170*, 1–13. [[CrossRef](#)]
9. Sánchez, N.S.; Calahorra, M.; Ramírez, J.; Peña, A. Salinity and high pH affect energy pathways and growth in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Biol.* **2018**, *122*, 977–990. [[CrossRef](#)]
10. Jamieson, D.J. Oxidative stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **1998**, *14*, 1511–1527. [[CrossRef](#)]
11. Skoneczny, M.; Rytka, J. Oxygen and haem regulate the synthesis of peroxisomal proteins: Catalase A, acyl-CoA oxidase and Pex1p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; the regulation of these proteins by oxygen is not mediated by haem. *Biochem. J.* **2000**, *1*, 313–319. [[CrossRef](#)]
12. González, J.; Castillo, R.; García-Campos, M.A.; Noriega-Samaniego, D.; Escobar-Sánchez, V.; Romero-Aguilar, L.; Alba-Lois, L.; Segal-Kischinevzky, C. Tolerance to oxidative stress in budding yeast by heterologous expression of catalases A and T from *Debaryomyces hansenii*. *Curr. Microbiol.* **2020**, *77*, 4000–4015. [[CrossRef](#)]
13. Mortensen, H.D.; Jacobsen, T.; Koch, A.G.; Arneborg, N. Intracellular pH homeostasis plays a role in the tolerance of *Debaryomyces hansenii* and *Candida zeylanoides* to acidified nitrite. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 4835–4840. [[CrossRef](#)]
14. Lant, J.; Berg, M.; Heinemann, I.; Brandl, C.; O'Donoghue, P. Pathways to disease from natural variations in human cytoplasmic tRNAs. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 5294–5308. [[CrossRef](#)]

15. Mohler, K.; Ibba, M. Translational fidelity and mistranslation in the cellular response to stress. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 17117. [[CrossRef](#)]
16. Hoffman, K.; O'Donoghue, P.; Brandl, C. Mistranslation: From adaptations to applications. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Gen. Subj.* **2017**, *1861*, 3070–3080. [[CrossRef](#)]
17. Reynolds, N.; Lazazzera, B.; Ibba, M. Cellular mechanisms that control mistranslation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 849–856. [[CrossRef](#)]
18. Meyerovich, M.; Mamou, G.; Ben-Yehuda, S. Visualizing high error levels during gene expression in living bacterial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 11543–11548. [[CrossRef](#)]
19. Javid, B.; Sorrentino, F.; Toosky, M.; Zheng, W.; Pinkham, J.; Jain, N.; Pan, M.; Deighan, P.; Rubin, E.J. Mycobacterial mistranslation is necessary and sufficient for rifampicin phenotypic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 1132–1137. [[CrossRef](#)]
20. Schwartz, M.; Pan, T. Temperature dependent mistranslation in a hyperthermophile adapts proteins to lower temperatures. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *44*, 294–303. [[CrossRef](#)]
21. Pang, Y.; Abo, R.; Levine, S.; Dedon, P. Diverse cell stresses induce unique patterns of tRNA up- and down-regulation: tRNA-seq for quantifying changes in tRNA copy number. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, e170. [[CrossRef](#)]
22. Chan, C.; Pang, Y.; Deng, W.; Babu, I.; Dyavaiah, M.; Begley, T.; Dedon, P. Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 937. [[CrossRef](#)]
23. Kawaguchi, Y.; Honda, H.; Taniguchi-Morimura, J.; Iwasaki, S. The codon CUG is read as serine in an asporogenic yeast *Candida cylindracea*. *Nature* **1989**, *341*, 164–166. [[CrossRef](#)]
24. Suzuki, T. The 'polysemous' codon—a codon with multiple amino acid assignment caused by dual specificity of tRNA identity. *EMBO J.* **1997**, *16*, 1122–1134. [[CrossRef](#)]
25. Krassowski, T.; Coughlan, A.Y.; Shen, X.; Zhou, X.; Kominek, J.; Opulente, D.A.; Riley, R.; Maheshwari, N.; Shields, D.C.; Kurtzman, C.P.; et al. Evolutionary instability of CUG-Leu in the genetic code of budding yeasts. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1887. [[CrossRef](#)]
26. Moura, G.; Paredes, J.; Santos, M. Development of the genetic code: Insights from a fungal codon reassignment. *FEBS Lett.* **2009**, *584*, 334–341. [[CrossRef](#)]
27. Santos, M.; Gomes, A.; Santos, M.; Carreto, L.; Moura, G. The genetic code of the fungal CTG clade. *C. R. Biol.* **2011**, *334*, 607–611. [[CrossRef](#)]
28. Rocha, R.; Pereira, P.; Santos, M.; Macedo-Ribeiro, S. Unveiling the structural basis for translational ambiguity tolerance in a human fungal pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 14091–14096. [[CrossRef](#)]
29. Ji, Q.; Fang, Z.; Ye, Q.; Ruan, Z.; Zhou, X.; Wang, E. C-terminal domain of leucyl-tRNA synthetase from pathogenic *Candida albicans* recognizes both tRNA^{Ser} and tRNA^{Leu}. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 3613–3625. [[CrossRef](#)]
30. Wright, R. Transmission electron microscopy of yeast. *Microsc. Res. Tech.* **2000**, *51*, 496–510. [[CrossRef](#)]
31. Schmitt, M.; Brown, T.; Trumpower, B. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 3091–3092. [[CrossRef](#)]
32. Kyte, J.; Doolittle, R. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **1982**, *157*, 105–132. [[CrossRef](#)]
33. Eisenberg, D.; Weiss, R.; Terwilliger, T. The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 140–144. [[CrossRef](#)]
34. Eisenberg, D.; Schwarz, E.; Komaromy, M.; Wall, R. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* **1984**, *179*, 125–142. [[CrossRef](#)]
35. Perreau, V.M.; Keith, G.; Holmes, W.M.; Przykorska, A.; Santos, M.A.; Tuite, M.F. The *Candida albicans* CUG-decoding ser-tRNA has an atypical anticodon stem-loop structure. *J. Mol. Biol.* **1999**, *293*, 1039–1053. [[CrossRef](#)]
36. Santos, M.A.; Keith, G.; Tuite, M.F. Non-standard translational events in *Candida albicans* mediated by an unusual seryl-tRNA with a 5'-CAG-3' (leucine) anticodon. *EMBO J.* **1993**, *12*, 607–616. [[CrossRef](#)]
37. Ladner, J.; Jack, A.; Robertus, J.; Brown, R.; Rhodes, D.; Clark, B.; Klug, A. Structure of yeast phenylalanine transfer RNA at 2.5 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 4414–4418. [[CrossRef](#)]
38. Santos, M.A.; Perreau, V.M.; Tuite, M.F. Transfer RNA structural change is a key element in the reassignment of the CUG codon in *Candida albicans*. *EMBO J.* **1996**, *15*, 5060–5068. [[CrossRef](#)]
39. De la Fuente-Colmenares, I.; González, J.; Ochoa-Gutiérrez, D.; Norma, S.S.; Escobar-Sánchez, V.; Segal-Kischinevsky, C. Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX: Mexico City, México, 2022; *manuscript in preparation*.
40. Ribeiro, R.A.; Bourbon-Melo, N.; Sá-Correia, I. The cell wall and the response and tolerance to stresses of biotechnological relevance in yeasts. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 953479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Lin, N.X.; Xu, Y.; Yu, X.W. Overview of yeast environmental stress response pathways and the development of tolerant yeasts. *Syst. Microbiol. Biomanuf.* **2022**, *2*, 232–245. [[CrossRef](#)]
42. Sousa-Lopes, A.; Antunes, F.; Cyrne, L.; Marinho, H.S. Decreased cellular permeability to H₂O₂ protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase against oxidative stress. *FEBS Lett.* **2004**, *578*, 152–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Pace, C.N.; Grimsley, G.R.; Scholtz, J.M. Protein ionizable groups: pK values and their contribution to protein stability and solubility. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 13285–13289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Deole, R.; Challacombe, J.; Raiford, D.; Hoff, W. An Extremely Halophilic Proteobacterium Combines a Highly Acidic Proteome with a Low Cytoplasmic Potassium Content. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 581–588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Kennedy, S.; Ng, W.; Salzberg, S.; Hood, L.; DasSarma, S. Understanding the adaptation of halobacterium species NRC-1 to its extreme environment through computational analysis of its genome sequence. *Genome Res.* **2001**, *11*, 1641–1650. [[CrossRef](#)]
46. Turk, M.; Montiel, V.; Žigon, D.; Plemenitaš, A.; Ramos, J. Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. *Microbiology* **2007**, *153*, 3586–3592. [[CrossRef](#)]
47. Lages, F.; Silva-Graça, M.; Lucas, C. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: A study of 42 species. *Microbiology* **1999**, *145*, 2577–2585. [[CrossRef](#)]
48. Montiel, V.; Ramos, J. Intracellular Na⁺ and K⁺ distribution in *Debaryomyces hansenii*. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of DhNHX1. *FEMS Yeast Res.* **2007**, *7*, 102–109. [[CrossRef](#)]
49. Lanyi, J.K. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **1974**, *38*, 272–290. [[CrossRef](#)]
50. Miranda, I.; Rocha, R.; Santos, M.C.; Mateus, D.D.; Moura, G.; Carreto, L.; Santos, M.A.S. A genetic code alteration is a phenotype diversity generator in the human pathogen *Candida albicans*. *PLoS ONE* **2007**, *2*, e996. [[CrossRef](#)]
51. Gori, K.; Knudsen, P.B.; Nielsen, K.F.; Arneborg, N.; Jespersen, L. Alcohol-based quorum sensing plays a role in adhesion and sliding motility of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.* **2011**, *11*, 643–652. [[CrossRef](#)]
52. Segal-Kischinevzky, C.; Romero-Aguiar, L.; Alcaraz, L.D.; López-Ortiz, G.; Martínez-Castillo, B.; Torres-Ramírez, N.; Sandoval, G.; González, J. Yeast inhabiting extreme environments and their biotechnological applications. *Microorganisms* **2022**, *10*, 794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Precup, J.; Ulrich, A.; Roopnarine, O.; Parker, J. Context specific misreading of phenylalanine codons. *Mol. Gen. Genet.* **1989**, *218*, 397–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Parker, J.; Friesen, J. “Two out of three” codon reading leading to mistranslation in vivo. *Mol. Gen. Genet.* **1980**, *177*, 439–445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Swanson, R.; Hoben, P.; Summer-Smith, M.; Uemura, H.; Watson, L.; Söll, D. Accuracy of *in vivo* aminoacylation requires proper balance of tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* **1988**, *242*, 1548–1551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Trevino, S.R.; Scholtz, J.M.; Pace, C.N. Amino acid contribution to protein solubility: Asp, Glu, and Ser contribute more favorably than the other hydrophilic amino acids in RNase Sa. *J. Mol. Biol.* **2007**, *366*, 449–460. [[CrossRef](#)]
57. Miranda, I.; Silva-Dias, A.; Rocha, R.; Teixeira-Santos, R.; Coelho, C.; Gonçalves, T.; Santos, M.A.; Pina-Vaz, C.; Solis, N.V.; Filler, S.G.; et al. *Candida albicans* CUG mistranslation is a mechanism to create cell surface variation. *mBio* **2013**, *30*, e00285-13. [[CrossRef](#)]
58. Garcia-Rubio, R.; de Oliveira, H.C.; Rivera, J.; Trevijano-Contador, N. The fungal cell wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* species. *Front. Microbiol.* **2020**, *10*, 2993. [[CrossRef](#)]
59. Sharma, A.; Srivastava, S. Anti-*Candida* activity of two-peptide bacteriocins, plantaricins (Pln E/F and J/K) and their mode of action. *Fungal Biol.* **2014**, *118*, 264–275. [[CrossRef](#)]
60. Tsuji, T.; Fujimoto, T. Lipids and lipid domains of the yeast vacuole. *Biochem. Soc. Trans.* **2018**, *46*, 1047–1054. [[CrossRef](#)]
61. Mårtensson, C.U.; Doan, K.N.; Becker, T. Effects of lipids on mitochondrial functions. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2017**, *1862*, 102–113. [[CrossRef](#)]
62. Lotan, R.; Nicolson, G.L. Plasma membranes of eukaryotes. In *Advanced Cell Biology*; Schwartz, L.M., Azar, M.M., Eds.; Van Nostrand-Reinhold: Princeton, NJ, USA, 1981; pp. 129–154.
63. Schlame, M. Protein crowding in the inner mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2021**, *1862*, 148305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Guigas, G.; Weiss, M. Effects of protein crowding on membrane systems. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2016**, *1858*, 2441–2450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]