

00366



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México



ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA EN LA LEVADURA
MARINA *Debaryomyces hansenii* A DIFERENTES
CONDICIONES DE SALINIDAD.

T E S I S

que para obtener el grado académico de

Maestra en Ciencias

(Biología Marina)

presenta

Daniela Elvira Castro Granados

Director de Tesis: Dr. Antonio Peña Díaz

Comité Tutorial: Dr. Martín Merino Ibarra

Dra. Patricia Thomé Ortiz

Dr. Salvador Uribe Carvajal

México, D. F.

Agosto, 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

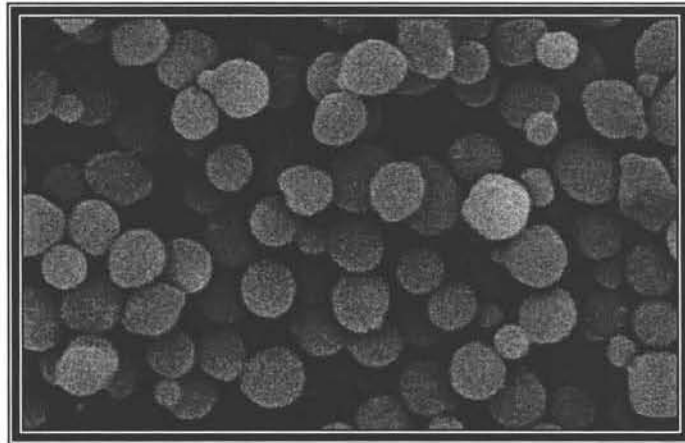
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

*“Estudio de la expresión genética en la levadura marina *Debaryomyces hansenii* a diferentes condiciones de salinidad.”*



Este trabajo se realizó en el laboratorio de Genética Molecular y en la Unidad de Microarreglos de DNA del Instituto de Fisiología Celular UNAM, bajo la asesoría del Dr. Jorge Ramírez Salcedo y el M en IBB Simón Guzmán León.

JURADO DE EXAMEN

Presidente	Dr. Manuel Uribe Alcocer
Secretario	Dr. Antonio Peña Díaz
Vocal	Dr. Martín Merino Ibarra
Suplente	Dr. Salvador Uribe Carvajal
Suplente	Dra. Patricia Thomé Ortiz

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

NOMBRE: Daniela Castro
Granados

FECHA: 04 Agosto / 2004

FIRMA: Daniela Castro

A mis abuelitos

Juan Antonio Granados y Aurora González

q . p . d .

**DEDICO ESTE TRABAJO DE MANERA MUY
ESPECIAL A...**

 Mi abuelita “chata” por enseñarme a enfrentar los
tropiezos que la vida nos presenta, por ser una mujer
 valiente, y por darme tanto cariño.

 Mi abuelito “güero” por su fortaleza y deseo de salir
 adelante...

Agradecimientos

- Al Dr. Antonio Peña Díaz por ser mi director de tesis, por ser un ejemplo a seguir en el campo de la ciencia, por darme su confianza y dedicarme parte de su tiempo, y por compartir conmigo su conocimiento y experiencia.
- Al Dr. Jorge Ramírez Salcedo por todo el apoyo y tiempo invertido en este trabajo, por compartir sus ideas y haberme brindado su amistad.
- Al cuerpo técnico de la Unidad de Microarreglos de DNA (UMUNAM), del Instituto de Fisiología Celular (IFC) UNAM, el M en IBB Simón Guzmán, la QBP Lorena Chávez y el M en C José Luis Santillán, por la asesoría y el trabajo invertido en el desarrollo de esta tesis.
- Al comité tutoral integrado por el Dr. Antonio Peña Díaz, el Dr. Martín Merino Ibarra, la Dra. Patricia Thomé Ortiz y el Dr. Salvador Uribe Carvajal, por enriquecer el contenido de esta tesis y por haberme guiado durante el desarrollo de esta maestría.
- Al jurado de examen integrado por el Dr. Manuel Uribe Alcocer, el Dr. Antonio Peña Díaz, el Dr. Martín Merino Ibarra, el Dr. Salvador Uribe Carvajal y la Dra. Patricia Thomé Ortiz, por el tiempo invertido en la revisión y corrección de esta tesis.
- A mis compañeros de trabajo del laboratorio 306 del Departamento de Genética Molecular del IFC, Bertha, Carlos, Cristian, Gloria, Juan Carlos, Marissa, Martha, Norma, por su compañía y apoyo.
- Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL) UNAM por el apoyo académico, económico y técnico facilitado.

- A las secretarías del Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología del ICMyL, Norma y Lupita, y a la secretaria técnica Diana, del mismo posgrado, por todas sus atenciones y apoyo incondicional.
- Al Dr. Roberto Coria responsable del laboratorio 302 del departamento de Genética Molecular del IFC, por el material facilitado.
- A la UMUNAM, a las Unidades de Biología Molecular y de Microscopía del IFC UNAM por su apoyo técnico y servicios.
- Al IFC y al ICMyL UNAM por permitirme laborar en sus instalaciones.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Dirección General de Estudios de Posgrado UNAM (DGP) por las becas otorgadas para la realización de esta tesis.
- A los Proyectos 36070-N del CONACyT, y los IN223999 e IN202103 del Programa PAPIIT de la UNAM.

Y por último agradezco infinitamente a mi familia... a mis padres Raúl y Elvira por haberme dado la educación necesaria para mi desarrollo profesional, por inculcarme el deseo de seguir superándome día a día y por todo su cariño; a mis hermanos Orlando y Claudia por compartir conmigo sus experiencias de vida y enseñarme a ser compartida y tolerante; y a Luis Gabriel por todo su amor, compañía y apoyo incondicional que han hecho de estos cinco años que llevamos juntos, los más felices de mi vida.

A todos G R A C I A S.

Índice

Página

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
<i>Las levaduras</i>	2
<i>Microorganismos halófilos</i>	5
<i>Debaryomyces hansenii</i>	6
<i>Osmorregulación</i>	10
<i>Análisis genético</i>	15
<i>Microarreglos de DNA</i>	16
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS PARTICULARES	23
METODOLOGÍA	24
<i>Diseño experimental</i>	24
<i>Descripción, cultivo y mantenimiento de las cepas utilizadas</i>	26
<i>Aislamiento de DNA genómico</i>	27
<i>Curvas de crecimiento</i>	27
<i>Aislamiento de RNA total</i>	28
<i>Impresión de los microarreglos</i>	28

Índice de Tablas

	<i>Página</i>
Tabla 1: Composición química del agua de mar en orden de abundancia .	4
Tabla 2: Marcaje de las sondas en cada microarreglo. . . .	30
Tabla 3. Genes de <i>D. hansenii</i> que aumentaron o disminuyeron su expresión a 0.6, 1.2 y 2.0 M de NaCl	45
Tabla 4: Vías metabólicas en las que participan genes de <i>D. hansenii</i> sobreexpresados a 2.0 M de NaCl	47
Tabla 5: Cambios de expresión de los genes de <i>D. hansenii</i> sobreexpresados en 2.0 M de NaCl	80

Índice de Figuras

Figura 1. Microfotografía electrónica de células de <i>D. hansenii</i> . . .	7
Figura 2. Vía HOG en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
Figura 3: Impresor de microarreglos de DNA de contacto	18
Figura 4. Electroforesis DNA genómico de <i>D. hansenii</i> y <i>S. cerevisiae</i> .	35
Figura 5. Microarreglo con DNA de <i>D. hansenii</i> cultivada en YPD sin sal .	37
Figura 6. Microarreglo con DNA de <i>S. cerevisiae</i> cultivada en YPD sin sal vs. DNA de <i>D. hansenii</i> cultivada en YPD sin sal	38

Figura 7. Crecimiento de <i>S cerevisiae</i> y <i>D. hansenii</i> en diferentes concentraciones de NaCl	39
Figura 8. Electroforésis RNA total de <i>D. hansenii</i> cultivada en diferentes concentraciones de NaCl	40
Figura 9. Microarreglo con RNA total de <i>D. hansenii</i> cultivada en YPD sin sal vs. RNA total de <i>D. hansenii</i> cultivada en YPD 0.6 M de NaCl	42
Figura 10. Microarreglo con RNA total de <i>D. hansenii</i> cultivada en YPD sin sal vs. RNA total de <i>D. hansenii</i> cultivada en YPD 1.2 M de NaCl	43
Figura 11. Microarreglo con RNA total de <i>D. hansenii</i> cultivada en YPD sin sal vs. RNA total de <i>D. hansenii</i> cultivada en YPD 2.0 M de NaCl	44
Figura 12. Vías de señalización MAPK en <i>S. cerevisiae</i> donde se localizan genes de <i>D. hansenii</i> sobreexpresados a 2.0 M de NaCl	50
Figura 13. Secuencia del gen homólogo <i>SLN1</i> en <i>D. hansenii</i>	52
Figura 14. Características de los oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia del gen homólogo <i>SLN1</i> en <i>D. hansenii</i>	53
Figura 15. Electroforésis de los productos de la amplificación por PCR de la región del gen homólogo <i>SLN1</i> en <i>D. hansenii</i>	53
Figura 16. Electroforesis del RT/PCR en <i>D. hansenii</i>	55

Resumen

La salinización de los suelos es un problema para la agricultura a nivel mundial y para resolverlo se ha estudiado a los organismos halófilos, capaces de desarrollarse en ambientes salinos, para explicar las bases moleculares y bioquímicas que les permitieron adaptarse e identificar los genes responsables para transferirlos a plantas para que puedan crecer en terrenos salinos. La levadura marina *D. hansenii*, halófila por naturaleza, es un excelente modelo para el estudio de los mecanismos de tolerancia al estrés salino. Dado que no existe la biblioteca genómica de *D. hansenii*, se utilizaron los microarreglos de DNA de otra levadura relacionada filogenéticamente, *S. cerevisiae*; para estudiar la expresión genética de *D. hansenii* en 0.6, 1.2 y 2.0 M de NaCl y localizar los genes cuya expresión cambió en su presencia. Se hicieron 5 microarreglos:

Microarreglo	1	2	3		4		5		
Sonda	DNA <i>D. h.</i> sin sal	DNA <i>S. c.</i> sin sal	DNA <i>D. h.</i> sin sal	RNA m <i>D. h.</i> sin sal	RNA m <i>D. h.</i> 0.6 M NaCl	RNA m <i>D. h.</i> sin sal	RNA m <i>D. h.</i> 1.2 M NaCl	RNA m <i>D. h.</i> sin sal	RNA m <i>D. h.</i> 2.0 M NaCl
Fluoróforo	Cy3	Cy3	Cy5	Cy3	Cy5	Cy3	Cy5	Cy3	Cy5

De un total de 6017 genes impresos en cada microarreglo heterólogo, en el No. (1) hibridaron 3117 genes, en el (2) 251 genes, en el (3) se sobre-expresaron 45 genes y se reprimieron 211, en el (4) 94 genes sobre-expresados y 324 reprimidos, y en el (5) 235 genes sobre-expresados y 701 reprimidos. Entre un 4 y un 15 % del genoma respondió a la sal. En el microarreglo (5) se sobre-expresaron los genes *SHO1*, *SLN1* y *SSK22*, pertenecientes a la vía de respuesta a alta osmolaridad por glicerol (HOG) en *S. cerevisiae*, que estimula la respuesta transcripcional para contrarrestar el estrés osmótico. Con la secuencia del gen homólogo *SLN1* en *D. hansenii* se diseñaron primers para amplificar la región de *SLN1* por un método diferente al microarreglo, el RT/PCR, y comprobar su sobre-expresión. Los productos obtenidos aumentaron en relación directa con la concentración de NaCl, a menor concentración menor fue la intensidad de los productos obtenidos comparados con la intensidad obtenida en las concentraciones mayores. Para que en un microarreglo heterólogo pueda haber hibridación es necesario que las secuencias de los genes de las dos especies en competencia tengan entre un 28 a un 85 % de identidad. En las tres concentraciones de NaCl el número de genes reprimidos fue mayor que el de los sobre-expresados y el número de cambios en los niveles de expresión, para ambos sentidos, aumentó en relación directa con la concentración de sal. De los genes sobre-expresados se identificaron genes que codifican para enzimas del metabolismo de carbohidratos y lípidos, transporte de aminoácidos, y de respuesta general a estrés.

Introducción

Las levaduras

Las levaduras han estado ligadas a la vida humana desde la antigüedad, por la producción de cerveza, vino y pan. Los primeros reportes pueden fecharse en Sumeria alrededor del año 7000 AC. Tienen importancia a nivel industrial y biomédico por muchos de sus productos metabólicos como las vitaminas, el etanol, el ácido cítrico, los lípidos, etc., y en la actualidad han participado en el desarrollo de la genética y la biología molecular. Dado lo pequeño de sus genomas, ofrecen la oportunidad única de explorar la evolución del genoma eucarionte por medio del análisis comparativo entre muy diversas especies, incluyendo la humana; *Saccharomyces cerevisiae* fue el primer organismo eucariótico en ser secuenciado, y ha contribuido al rápido y reciente surgimiento de las ciencias genómicas (Souciet *et. al.*, 2000).

Las levaduras pertenecen a un grupo de hongos filogenéticamente diverso perteneciente a la clase Ascomiceta (McNeill, 1979). Los ascomicetos han sido objeto de numerosos estudios taxonómicos que han permitido modificaciones en su clasificación, que actualmente está compuesta por 3 grupos: Archiascomicetos, Euascomicetos y Hemiascomicetos; las levaduras pertenecen a este último grupo (Souciet *et. al.*, 2000). En su ciclo de vida presentan una fase unicelular que se reproduce por gemación o fusión; y pueden formar esporas sexuales llamadas ascosporas. Son reconocidas por la típica morfología de sus colonias celulares que se distingue de la bacteriana, por los grandes tamaños de sus células (McNeill, 1979).

Las levaduras pueden encontrarse como constituyentes de las poblaciones marinas, y aunque sus números disminuyan al irse alejando del continente, son el hongo dominante en el mar abierto. En las aguas intercontinentales las poblaciones de levaduras están integradas por gran variedad de especies

correspondientes a las clases Ascomiceta, Basidiomiceta y Deuteromiceta. Al irse adentrando a mar abierto la variedad de especies disminuye y los ascomicetos se vuelven escasos, con excepción de la especie *Debaryomyces hansenii* (McNeill, 1979).

Las investigaciones sobre levaduras marinas, así como su distribución y presencia en diferentes sustratos, ha sido abordada desde los años 60's. Se pueden encontrar asociadas a sustratos ricos en materia orgánica como superficies de animales, en el tracto digestivo de peces y desechos vegetales, o bien libres en la columna de agua (McNeill, 1979), de donde se han aislado desde los 0 hasta los 3950 m (Van y Fell, 1968).

El ambiente donde se reproducen suele ser el siguiente:

⇒ *Medio alcalino:*

Algunas especies de iones presentes en el agua de mar son producto de la hidrólisis de ácidos y bases. El equilibrio logrado por las especies de ácidos débiles y minerales, mantiene el pH del agua de mar a un valor constante de 8.0. A este pH, las especies dominantes son carbonato, bicarbonato, amonio, fosfato dibásico, fosfato monobásico, ácido bórico y ácido silícico (Libes, 1992).

⇒ *Alta concentración de sales:*

Más del 99% de las sustancias disueltas en el agua de mar, corresponde a seis iones mayores que se mantienen en proporciones constantes debido a que sus concentraciones son controladas por procesos físicos como: precipitación, evaporación, congelamiento, difusión molecular de iones entre las masas de agua, etc., y se les conoce como iones conservativos. Los demás componentes que no están presentes en proporciones constantes porque sus concentraciones son alteradas por reacciones químicas, que se llevan a cabo en los sedimentos y el océano, son llamados iones menores o no conservativos (Libes, 1992).

La clasificación de las sustancias disueltas en el agua de mar y el promedio de sus concentraciones están representados en la Tabla 1.

Tabla 1: Composición química del agua de mar en orden de abundancia. (Libes, 1992).

CATEGORIA	EJEMPLOS	CONCENTRACIÓN
Iones mayores	Cl^- , Na^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , Ca^{2+} , K^+	mM
Iones menores	HCO_3^- , Br^- , Sr^{2+} , F^-	μM
Gases	N_2 , O_2 , Ar, CO_2 , N_2O , $(\text{CH}_3)_2\text{S}$, H_2S , H_2 , CH_4	nM a mM
Nutrientes	NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , H_4SiO_4	μM
Metales traza	Ni, Li, Fe, Mn, Zn, Pb, Cu, Co, U, Hg	$< 0.05 \mu\text{M}$
Compuestos orgánicos disueltos	Aminoácidos, ácidos húmicos	Ng/L a mg/L
Coloides	Espuma de mar, flóculos	$\leq \text{mg/L}$
Materia particulada	Arena, arcilla, tejidos muertos, organismos, heces	$\mu\text{g/L}$ a mg/L

La salinidad es la medida más usada para medir la cantidad de sales presentes en el agua de mar y se define teóricamente como el número total de gramos de las sales iónicas disueltas en un kilogramo de agua de mar; sus

unidades están en partes por mil y se representan por el símbolo ‰. El promedio de la salinidad del agua de mar es de 35‰, el cual equivale a un solución con 3.5% de sal (Libes, 1992). La salinidad puede representarse matemáticamente como:

$$S (\text{‰}) = \frac{\text{g de iones disueltos}}{1 \text{ Kg de agua de mar}} \times 1000$$

Microorganismos halófilos

La salinidad afecta las respuestas funcionales y estructurales de los organismos y algunos mecanismos de adaptación a los cambios en la concentración de la salinidad son (Kinne, 1971): a) absorción y excreción de agua y/o sal, b) cambios de la permeabilidad de la membrana a la sal, c) modificaciones de la composición química de los fluidos corporales, d) tolerancia de los tejidos a variaciones en la osmoconcentración total y composición iónica, e) depósito de agua y/o sal en órganos y tejidos, f) disminución de la actividad metabólica, g) producción de moléculas orgánicas (osmolitos) para compensar la presión osmótica elevada del medio, h) cambios en la respiración, tamaño del cuerpo y gases disueltos, etc.

Los microorganismos halófilos son aquéllos que se encuentran en ambientes hipersalinos, y se diferencian de los halotolerantes (crecen en un amplio rango de salinidades) porque son capaces de reproducirse y realizar sus funciones metabólicas de manera más eficaz en presencia de altas concentraciones de sales y resisten los efectos nocivos de la sal. Se clasifican como poco, moderados y extremadamente halófilos, según los requerimientos de NaCl para su crecimiento. Los poco halófilos tienen un crecimiento óptimo a 0.2–0.85 mol L⁻¹ (2–5%) de NaCl; los halófilos moderados a 0.85–3.4 mol L⁻¹ (5–20%) de NaCl; y los halófilos extremos por arriba de 3.4 mol L⁻¹ (20–30%) de NaCl. Los no halófilos tienen un crecimiento óptimo en menos de 0.2 mol L⁻¹ NaCl (Revisado en González y Peña, 2002).

El interés por conocer los mecanismos de adaptación de estos organismos a los medios salinos, tiene importancia académica y biotecnológica. Hay enormes regiones en el mundo en las que el riego continuo y la evaporación han resultado en su salinización, haciendo cada vez más difícil, y en ocasiones imposible, cultivarlas para la agricultura, dado que las plantas de interés en este sentido suelen mostrar escasa tolerancia a la sal.

Uno de los enfoques que se ha utilizado es la búsqueda de cepas de *S. cerevisiae* resistentes a altas concentraciones de sal. Otro consiste en detectar genes que por su función (sobre-expresados o no), confieran resistencia a la salinidad en diversos microorganismos, con la idea de encontrar genes que puedan transferirse a las plantas y estas puedan resistir altas concentraciones de sal. Finalmente, el estudio de microorganismos naturalmente resistentes o adaptados a vivir en medios salinos y de los mecanismos implicados, podría ofrecer posibilidades semejantes, tal es el caso de algunos hongos, y en particular para nosotros, el de *D. hansenii*.

Debaryomyces hansenii

La levadura marina *D. hansenii* (Fig. 1) es un organismo halófilo moderado que ha colonizado una amplia diversidad de microhábitats, que sugieren la existencia de distintas subpoblaciones que se han adaptado a ellos. Se han descrito dos variedades: *D. hansenii* var. *hansenii* y *D. hansenii* var. *fabryii*. El tamaño de sus células es de 2 a 3.6 μm por 2.5 a 4 μm (Norkrans, 1966).

Esta levadura, de gran interés industrial y agrícola se encuentra en todos los tipos de quesos, embutidos, carne, vino, cerveza, fruta y suelo (Corredor *et. al.*, 2003). Aunque es la especie más abundante en todos los quesos, existen otras levaduras que comparten también este hábitat; por lo que para su estudio, Corredor y colaboradores (2000) desarrollaron un método de identificación rápido y sensitivo para *D. hansenii* var. *hansenii*, basado en la hibridación de secuencias especie-específicas.

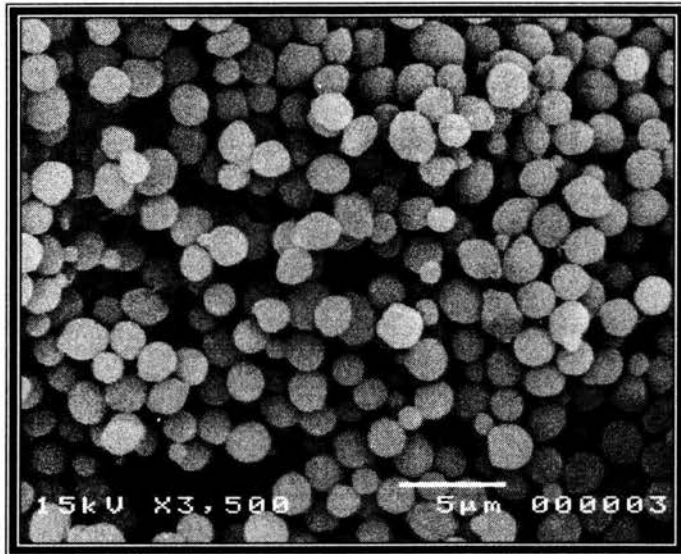


Figura 1. Microfotografía electrónica de células de *D. hansenii*. Laboratorio de microscopía electrónica del Instituto de Fisiología Celular UNAM.

Hernández y Ochoa (1999) llevaron a cabo la primera purificación de una proteína en *D. hansenii*, la enzima citosólica superóxido dismutasa de Cu-Zn. Esta enzima cataliza la inactivación de radicales libres para protegerse de los efectos tóxicos que estos representan. Yadav y Loper (1999) aislaron y secuenciaron en *D. hansenii*, dos genes pertenecientes a la familia de los citocromos P450 las cuales catalizan reacciones de monoxidación que transforman compuestos lipofílicos en metabolitos más polares, con uso en la producción industrial y farmacéutica; como la biodegradación de n-alcanos y la producción de ácidos grasos, alcoholes y ácidos dicarboxílicos. A estos genes los llamaron *DH-AKL1* y *DH-ALK2*.

D. hansenii metaboliza ácidos orgánicos, amino ácidos, y péptidos mediante dos enzimas: la prolil aminopeptidasa (PAP), que degrada péptidos pequeños con prolina, contribuyendo a la reducción del sabor amargo que se produce durante la fermentación de la carne; y la metalo arginil aminopeptidasa (AAP) activada por Co^{2+} , que lleva a cabo la proteólisis de moléculas en pequeños

fragmentos que dan sabor específico a los embutidos. *D. hansenii* regula la acidez de los productos fermentados, (por los ácidos láctico y cítrico), y proporciona actividad lipolítica y proteolítica que contribuye al desarrollo del sabor durante la maduración de los quesos (Bolumar *et. al.*, 2003).

D. hansenii acumula gran cantidad de glicerol hasta la fase estacionaria de crecimiento (en un medio con 4 mM y 2.7 mM de NaCl), y una vez que ha sido consumido (al igual que la glucosa) comienza la producción de arabinosa (Adler y Gustafsson, 1980). También produce xilitol, que se utiliza en la industria alimenticia por sus propiedades edulcorantes, anticaries, y por ser tolerado por los diabéticos (Gírio *et. al.*, 2000). Con la producción de los polioles decrece la producción de etanol, que se acumula en pequeñas cantidades. Con excepción de una pequeña cantidad de prolina, no acumula aminoácidos en respuesta a la salinidad (González, y Peña, 2002).

Veiga y colaboradores (2003) encontraron que en *D. hansenii*, durante la fase exponencial de crecimiento y bajo condiciones aeróbicas y de estrés (bajas temperaturas, choque osmótico, agentes patógenos y H₂O₂), se induce la respiración resistente al cianuro (CRR). La CRR es una vía metabólica que involucra una oxidasa alterna (AOX) que se comporta como un pequeño circuito en la cadena respiratoria, llevando los electrones directamente desde la ubiquinona al oxígeno, sin pasar por el complejo III y IV. Como consecuencia, esta respiración es insensible a la antimicina A y al cianuro, pero se inhibe específicamente por el ácido salicilhidroxámico (SHAM). En general, las levaduras que llevan a cabo la CRR también tienen el complejo I, sugiriendo que la energía puede ser originada de la actividad de la CRR por el bombeo de H⁺ a través del complejo I. El desvío del flujo metabólico a través de la CRR les proporciona un mecanismo para el ajuste de la energía disponible bajo diferentes condiciones fisiológicas.

D. hansenii tiene un mecanismo de transporte de iones similar al de *S. cerevisiae*, aunque con una menor capacidad en el bombeo de protones. La H⁺-

ATPasa contribuye al bombeo de protones, generando una diferencia en el potencial de membrana, y que es aprovechado para el transporte de K^+ ó Na^+ a través de un antiportador (Thomé *et. al.*, 1998). *D. hansenii* tiene una mayor capacidad para expulsar Na^+ de sus células y transportar K^+ hacia el interior en comparación con *S. cerevisiae*, y posee un metabolismo menos sensible al Na^+ intracelular que favorece el transporte de K^+ o lo sustituye cuando el primero es más abundante (Prista *et. al.*, 1997). La relación entre la concentración de K^+ y de Na^+ en *D. hansenii*, es mayor en el interior de sus células con respecto a la concentración en el medio y comparada con la relación existente en *S. cerevisiae* (González y Peña, 2002).

El Na^+ no es tóxico para *D. hansenii*, pues se ha visto que alcanza niveles intracelulares altos, y que esta levadura se desarrolla adecuadamente en su presencia, aún cuando la concentración de K^+ sea muy baja. Se ha reportado que el Na^+ no inhibe el transporte de K^+ , como sucede en *S. cerevisiae* sino lo estimula (Prista *et al.*, 1997), aunque otro reporte indica lo contrario (González *et. al.*, 2004). *D. hansenii* crece a pH más altos (8.2) que *S. cerevisiae* en presencia de ambos cationes; siendo el Na^+ el catión con mayor efecto sobre el crecimiento (Almagro *et. al.*, 2000). Esta levadura es resistente a pH alcalinos, y la acidificación del medio es más baja que en *S. cerevisiae* (Thomé *et. al.*, 1998). El Li^+ inhibe el crecimiento de ambas levaduras, aunque en *S. cerevisiae* es más tóxico. En ausencia de NaCl, ambas levaduras son capaces de crecer en presencia de bajas concentraciones de K^+ (Prista *et. al.*, 1997).

Entre las investigaciones realizadas dentro de la biología molecular de *D. hansenii*, Lépingle y colaboradores (2000), hicieron comparaciones (por BLASTX) entre el 20% del genoma disponible, hasta ese momento, de *D. hansenii* y otras levaduras, que revelaron que 1119 marcos de lectura abierta (ORFs) tienen homología con *S. cerevisiae* y 49 con otros genomas como: *Kluyveromyces lactis*, *Candida maltosa*, *Hansenula jadinii*, *Saccharomyces paradoxus*, *Pichia canadensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*,

Paracoccus denitrificans. De las comparaciones con *S. cerevisiae* encontraron que: a) la presencia de intrones se conserva entre los genes de ambas levaduras, pero no el tamaño ni la secuencia de estos; b) algunos genes de RNA de transferencia en *D. hansenii* tienen secuencias conservadas en genes de *S. cerevisiae*, c) el número total de genes que no tienen equivalencia con *S. cerevisiae* es de 250. Además identificación siete genes nucleares: *COX1*, *COX2* y *COX3* (subunidades de la citocromo c oxidasa); *COB* (apocitocromo b); *ATP9*, *ATP8* y *ATP6* (subunidades 9, 8 y 6 de la ATP sintasa); y 26 genes de RNA de transferencia. Almagro y colaboradores (2001) clonaron y secuenciaron dos genes que codifican para la ATPasa de Na⁺, *DhENA1* que se expresa en presencia de altas concentraciones de Na⁺, y *DhENA2* cuya expresión también requiere valores altos de pH.

Bansal y colaboradores (2001) aislaron el gen *URA3*, que codifica a la enzima orotidina-5'-fosfato descarboxilasa, que cataliza el último paso de la biosíntesis de las pirimidinas. Este gen es el marcador más usado en la selección de transformantes en varias especies de levaduras. Sherman y colaboradores (2004) determinaron la secuencia completa del genoma de *D. hansenii*; cuya información puede consultarse en la red en la dirección: <http://cbi.labri.fr/Genolevures/genolevures.php>.

Osmoregulación

Los cambios en las condiciones donde se desarrollan los organismos, ya sea en temperatura, presión, radiación, concentración de solutos y agua, pueden ocasionar alteraciones en sus ambientes intracelulares. Las células de levadura tienen la capacidad de responder a estos cambios mediante el mantenimiento de su homeostasis interna. Se conoce como estrés celular a las condiciones ambientales que amenazan la supervivencia de la célula o que impiden su óptimo desarrollo. El estrés osmótico es causado por cambios en la concentración de las moléculas disueltas en el medio celular externo. Un

aumento en la osmolaridad externa (estrés hiperosmótico) ocasiona que el agua salga de la célula, mientras que una disminución (estrés hipoosmótico), causa que el agua entre a ella (Hohmann y Mager, 2003).

Las células acumulan osmo-protectores específicos para contrarrestar la deshidratación causada por los cambios hiperosmóticos. Estos solutos no afectan los procesos bioquímicos y físicos dentro de las células, solamente incrementan su osmolaridad interna permitiendo la recuperación de agua, aumentando la tensión superficial, y sustituyendo al agua alrededor de las macromoléculas. Son producidos y/o tomados activamente del medio y se conocen por el nombre de solutos compatibles u osmolitos (Hohmann y Mager, 2003).

Los solutos compatibles tienen bajo peso molecular, son altamente solubles en agua, no tienen carga, y permiten a las enzimas funcionar eficientemente. Existen dos tipos principales: los polioles y azúcares, y los aminoácidos y sus derivados (Yancey *et. al.*, 1982). Los grupos OH de los polioles interactúan con los biopolímeros de la célula, estabilizándolos cuando el contenido de agua disminuye (Blomberg y Adler, 1992). Se acumulan en concentraciones elevadas, funcionando como osmo-protectores y fuentes de reserva. Entre ellos se encuentran polioles como el glicerol y arabinitol; azúcares como la sacarosa y trehalosa, u otros derivados, como el glucosilglicerol; aminoácidos y derivados de aminas cuaternarias, como la glicina, betaína y ectoína (revisado en González, y Peña, 2002; Gírio *et. al.*, 2000).

Las levaduras producen glicerol, arabinitol, eritritol y acumulan glucógeno como carbohidrato de reserva y trehalosa normalmente durante condiciones de disminución de crecimiento y como protector ante el estrés térmico y otras formas extremas de estrés osmótico, como la desecación y el congelamiento (González, y Peña, 2002; Larsson *et. al.*, 1993).

Se ha demostrado que en varias bacterias (*Salmonella typhimurium* y *Rhizobium meliloti*), el glutamato se acumula como un osmolito; sin embargo,

esta acumulación no se debe al incremento en la actividad de la enzima glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP (NADP-GDH), que cataliza la reducción del 2-oxoglutarato para formar glutamato. A pesar de que en *D. hansenii*, el glutamato no se acumula cuando se cultiva a esta levadura en presencia de NaCl; Alba y colaboradores (2004) observaron que la actividad de la NADP-GDH se incrementa en condiciones hiperosmóticas (1 M NaCl) y su actividad es inhibida por la fuerza iónica; además es más sensible a ésta que las dos isoenzimas de *S. cerevisiae*.

Las vías de señalización múltiple permiten que las células perciban y respondan rápidamente a las alteraciones en su medio, como los cambios osmóticos. En general, una vía proteína cinasa activada por mitógeno, traducida al español por sus siglas en inglés: MAPK, consta de tres proteína cinasas: una MAP cinasa (MAPK), una MAP cinasa cinasa (MAPKK), y una MAP cinasa cinasa cinasa (MAKKK). La MAKKK activa a la MAKK mediante la fosforilación de los residuos conservados de serina y/o treonina. La MAKK fosforila a la MAK en su residuo de treonina (serina) y/o tirosina, estimulando el paso de la MAK desde el citosol al núcleo, donde fosforila proteínas blanco. Las MAKKKs pueden ser activadas mediante la fosforilación a través de otra proteína cinasa o por la interacción con otras proteínas como las proteínas G (Hohmann y Mager, 2003).

En *S. cerevisiae* la más estudiada es la vía de respuesta del glicerol a alta osmolaridad, traducido al español por sus siglas en inglés: HOG (Fig. 2). Esta cascada de señalización está compuesta por cinco proteínas cinasas: tres MAKKK, Ss2p, Ssk22p y Ste11p que activan una MAKK, la Pbs2p, que activa a la MAPK, Hog1p. La vía es controlada por dos ramas independientes que regulan a Pbs2p, la rama Slnp1 y la Sho1p. La rama Slnp1 es más sensible que la Sho1p, lo que permite a la célula responder a una gran variedad de cambios osmóticos. Las dos ramas pueden interpretar cambios osmóticos por medio de diferentes estímulos físicos (Hohmann y Mager, 2003).

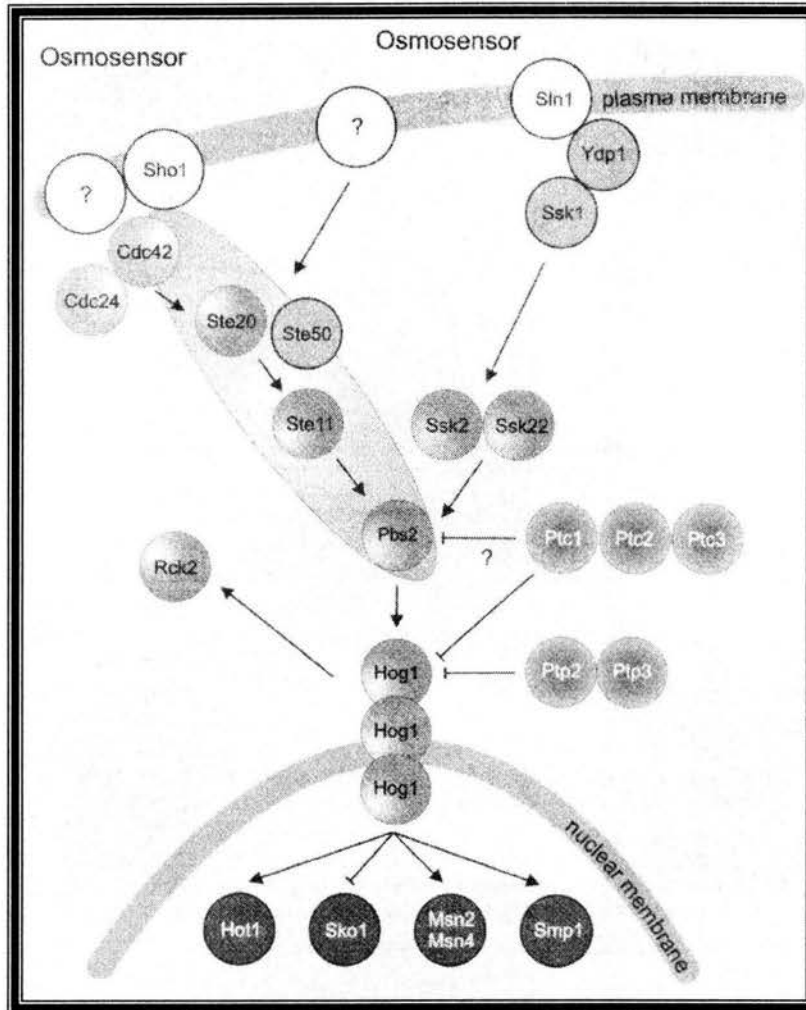


Figura 2. Vía HOG en *Saccharomyces cerevisiae* (Hohmann, 2003).

La rama Sln1p contiene un complejo de proteínas de tres componentes de señalización que son Sln1p, Ydp1p y Ssk1p; y regulan la acción de las MAKK Ssk2p y Ssk22p. Sln1p es una proteína de la membrana plasmática que contiene una región de unión, un dominio de histidina cinasa y un dominio receptor. El grupo fosfato de la histidina de una molécula de Sln1p es transferido hasta el residuo conservado de aspartato en la región carboxilo terminal del dominio receptor de otra molécula de Sln1p. Posteriormente, el fosfato es transferido al residuo de histidina de Ydp1p y luego al residuo conservado de

aspartato en el dominio receptor de Ssk1p. Cuando se acumula Ssk1p desfosforilado, éste activa a las MAPKKs Ssk2p y Ssk22p, mediante la unión entre el dominio receptor de Ssk1p y el dominio regulatorio N-terminal de Ssk2p. Esta unión ocasiona la autofosforilación de Ssk2p que activa a la MAPKK Pbs2p, la cual, fosforila y activa a Hog1p (Hohmann y Mager, 2003).

Sho1p tiene cuatro dominios transmembranales, un dominio de unión, y tres dominios SH3. Funciona como un gancho que recluta Pbs2p a la superficie celular. Su activación requiere un complejo formado por Sho1p y Pbs2p, que interactúan entre sí mediante la región N-terminal rica en prolina de Pbs2p y el dominio SH3 de Sho1p. Este complejo contiene también a la MAK Ste20p, a las MAKKK Ste11p y Ste50p, y a la proteína G Rho Cdc42p. El desenmascaramiento del dominio SH3 de Sho1p, durante estrés osmótico, hace que ésta se una a Pbs2p enganchándose a la superficie celular. Este evento marca la generación del complejo de señalización que recluta a Ste11p junto a las proteínas requeridas para su activación (Cdc42p, Ste20p, Ste50p), permitiendo la activación de Ste20p, la fosforilación de Ste11p y después la de Pbs2p (Hohmann y Mager, 2003).

La activación de Hog1p, ya sea a través de Sln1p ó Sho1p, induce la producción de glicerol; y el transporte de agua y glicerol es de importancia central en la osmoregulación en las levaduras. El glicerol es un alcohol polihidroxi producido durante la fermentación que se sintetiza a partir del intermediario glicolítico dihidroxiacetona fosfato. Primero, la dihidroxiacetona fosfato se reduce a glicerol-3-fosfato mediante la enzima citosólica glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD. Después el glicerol-3-fosfato es desfosforilado por la enzima glicerol-3-fosfato fosfatasa dependiente de NAD para producir glicerol (Hohmann y Mager, 2003).

Thomé (2004) aisló un gen en *D. hansenii* que complementó una mutante *gpd1*▲ de *S. cerevisiae*. Mediante la comparación (por BLAST) entre la secuencia completa de este gen y el gen *GPD1* de *S. cerevisiae*, que codifica

para la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, obtuvo una identidad del 65%; y con el gen *GPD2*, que codifica para la isoenzima, obtuvo una identidad del 71%; sugiriendo que el gen aislado es homólogo al gen *GPD1* de levaduras y por ello fue nombrado *DhGPD1*. Con una hibridación tipo Southern obtuvo un solo fragmento que correspondía a la prueba de *GDP*, lo que sugiere la existencia de un solo gen en *D. hansenii*. Sin embargo, durante la purificación, observó que la enzima existe en dos formas con diferentes actividades específicas y características iónicas; por lo que es posible que en *D. hansenii* un solo gen codifique para las dos isoenzimas, o que la prueba derivada de un gen (*GDP1*) no hibridize con el segundo gen (*GDP2*) como sucede en *S. pombe*.

Bansal y colaboradores (2001) aislaron un gen homólogo a *PBS2* en *D. hansenii*, al que llamaron *DPBS2*, y cuya expresión no es modulada por cambios en la osmolaridad del medio. Bansal y Mondal (2000) aislaron un gen homólogo a *HOG1* en *D. hansenii*, al que llamaron *DHOG1*, y que complementa la función de *HOG1* en *S. cerevisiae*; pero no le confiere tolerancia a la sal.

Análisis genético

El análisis genético permite la identificación de genes y/o proteínas importantes, como parte del proceso para comprender los mecanismos de adaptación o respuesta de los organismos a diversas condiciones ambientales, como la osmotolerancia y los mecanismos que la permiten (Hohmann y Mager, 2003). Los microorganismos en general y las levaduras en particular son excelentes modelos para estos estudios debido a su enorme capacidad de adaptación para enfrentar los cambios, a veces extremos, en los ambientes en que pueden encontrarse.

Uno de los métodos que más se ha utilizado consiste en analizar los cambios en la expresión de genes, en levaduras cultivadas o sometidas a distintas condiciones, bajo la premisa de que las respuestas observadas pueden señalar aquellos genes cuya actividad enciende o apaga en mayor o menor grado para

adaptarse a una nueva situación. Pueden utilizarse los microarreglos de DNA para el análisis de la respuesta transcripcional bajo estrés salino (Posas *et. al.*, 2000). Los estudios en microarreglos están produciendo grandes cantidades de datos sobre la expresión de los genes que prometen ser cruciales para profundizar en el conocimiento de sus funciones e interacciones entre y a través de las vías metabólicas (Brazma *et. al.*, 2001).

Microarreglos de DNA

Un microarreglo es un dispositivo analítico pequeño que permite la exploración genómica con velocidad y precisión sin precedente en la historia de la biología. Los chips de vidrio contienen miles de genes que son usados para examinar muestras fluorescentes preparadas con RNA mensajero marcado de células, tejidos y otras fuentes biológicas. Las moléculas en la muestra fluorescente reaccionan con la secuencia complementaria en el chip, causando que cada punto brille con una intensidad proporcional a la actividad expresada por cada gen. La gran capacidad de estos pequeños dispositivos permite el análisis del genoma humano completo en un solo experimento. Debido a que los patrones en la expresión de los genes se correlacionan fuertemente con la función, los microarreglos proveen información en enfermedades humanas, envejecimiento, efectos de fármacos y hormonas, enfermedades mentales, dietas y demás problemas clínicos (Sчена, 2003).

Los microarreglos fueron desarrollados en la Universidad de Stanford por Sचना y colaboradores a principios de los años 90s. La palabra microarreglo es una nueva palabra científica derivada del griego *mikro* (pequeño) y del francés *arayer* (ordenar). También conocidos como biochips, chips de DNA, chips de genes, contienen colecciones de pequeños elementos o puntos ordenados en filas y columnas (Sचना, 2003).

Un microarreglo es un arreglo ordenado de elementos microscópicos en un sustrato plano que permite la unión específica de genes o productos de genes.

Para calificar como microarreglo, el dispositivo analítico debe ser (1) ordenado, (2) microscópico, (3) plano, y (4) específico. Los dispositivos que no cumplan las cuatro características, no ofrecen las ventajas de los microarreglos, no califican como tales y no deben ser considerados como microarreglos (Schena, 2003).

Su elaboración comienza con la selección de la biblioteca genómica que se desea imprimir. Con la secuenciación sistemática de los genomas completos y los avances en la síntesis artificial del DNA es posible obtener en el laboratorio, el genoma completo de un organismo generando cada uno de los marcos de lectura abierta (ORF) completos o fragmentos de cada uno de ellos. En la actualidad se pueden adquirir las colecciones o bibliotecas completas de los genes de varios organismos, que se depositan en microplacas, en donde se conoce la ubicación exacta de cada uno de los genes. Se debe tener la mayor cantidad de información acerca de cada gen que está integrado en la biblioteca a imprimir, para poder utilizarla en la organización de la base de datos de los microarreglos; por ejemplo, el proceso biológico en el que participa o la función molecular que desarrolla (Ramírez *et. al.*, 2003).

Para su impresión es necesario amplificar el DNA genómico del organismo mediante cebadores (primers), o iniciadores específicos para cada gen, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. El DNA a imprimir debe tener la misma calidad que la utilizada en su secuenciación, y su cantidad en cada muestra debe ser la misma. Posteriormente se purifica cada producto obtenido por PCR y se prosigue a su impresión. Existen varios tipos de impresores; los de contacto (Fig. 3), los piezoeléctricos y los de síntesis directa de DNA sobre la superficie. Los de contacto depositan las muestras haciendo contacto con la superficie; son los más económicos, su uso es sencillo y no requiere de gran infraestructura. Constan de un brazo robótico con movimiento en los ejes X, Y, y Z; con una resolución de una décima de micra. Los aplicadores son pequeñas agujas con una ranura en la punta que toma la

muestra por capilaridad y la deposita por contacto. En la cabeza se colocan de 1 a 48 aplicadores. Las superficies sobre las que se imprimen los microarreglos pueden ser laminillas de vidrio semejantes a los portaobjetos utilizados en microscopía; y una vez impresas, el DNA debe ser fijado a la superficie homeando los microarreglos a 80° C o mediante un entrecruzador de luz ultravioleta (Ramírez *et. al.*, 2003).

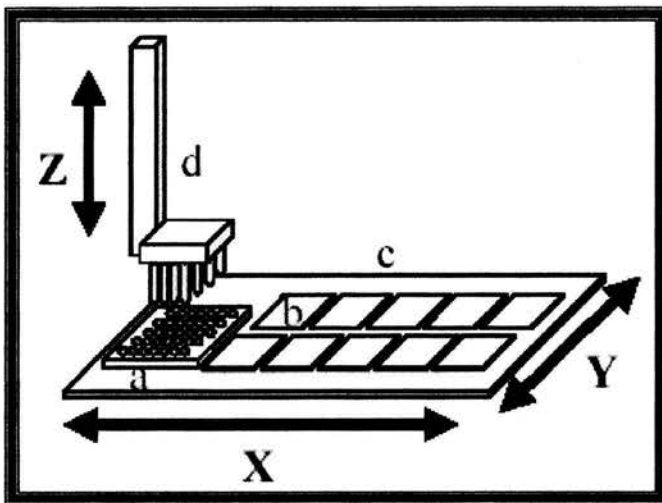


Figura 3: Diagrama de un impresor de microarreglos de DNA de contacto. a) microplaca para imprimir las muestras, b) laminillas, c) superficie de soporte, d) cabeza con aplicadores. (Ramírez *et. al.*, 2003).

Es necesario aislar el RNA de las muestras en las condiciones que se quieren estudiar. Para ello no es necesaria la purificación del RNA mensajero de la muestra; el empleo del RNA total es suficiente. Es importante que el RNA tenga las siguientes características: se requieren al menos 30 µg para realizar un experimento, debe estar lo más concentrado posible; la banda ribosomal grande (28S) debe ser al menos el doble de la banda pequeña (18S) y puede tolerar la presencia de DNA genómico en la muestra. Para el marcado del RNA total se utiliza la síntesis *in vitro* de DNA complementario (cDNA) de cadena

sencilla, poniendo a reaccionar el RNA junto con un deoxioligonucleótido poli T y un conjunto de nanómeros al azar, capaces de reconocer a sus bases complementarias en el RNA mensajero; se agregan los deoxinucleótidos A, C, G y T, deoxinucleótido T marcado con una molécula fluorescente (dUTP-Cy3 y dUTP-Cy5) y la enzima transcriptasa inversa (RT), para que se lleve a cabo la síntesis de cDNA a partir del RNA mensajero. La RT incorpora el deoxinucleótido T marcado en dos reacciones diferentes, una con el fluoróforo Cy3 y otra con el Cy5, ambos fluorescen, de diferente color. Finalmente, se purifica el cDNA marcado para eliminar el deoxinucleótido fluorescente no incorporado, para hibridarlo en el microarreglo (Ramírez *et. al.*, 2003).

En la hibridación, se aplica una solución junto con las dos muestras marcadas sobre el microarreglo, y se cubre con un cubreobjetos de manera que la mezcla cubra todo el microarreglo. Como la reacción requiere de poco volumen (no mayor de 50 µl) los microarreglos se colocan en cámaras húmedas diseñadas especialmente para evitar su evaporación y se dejan hibridar durante 12 hrs. o más. Terminado el tiempo se lavan. El secado se lleva a cabo mediante centrifugación, ya que cualquier residuo de sales puede afectar la lectura (Ramírez *et. al.*, 2003).

Existen dos tipos de lectores de microarreglos: los lectores con cámaras digitales y los confocales. En ambos tipos se utiliza un láser para excitar las moléculas fluorescentes unidas al cDNA y obtener la imagen de cada una de las muestras contenidas en el microarreglo, obteniendo dos imágenes, una para el fluoróforo Cy3 (rojo) y una para el fluoróforo Cy5 (azul). Los lectores confocales hacen una reconstrucción de la imagen mediante el uso de fotomultiplicadores para registrar la señal, son los mejores pues con ellos se obtiene una imagen de muy alta resolución, pero son más costosos. Para la obtención de las imágenes se ajusta la intensidad del láser y la sensibilidad de los fotomultiplicadores, de manera que ambas imágenes den valores semejantes de fluorescencia total. Una vez obtenidas las imágenes, se combinan para obtener la imagen final del

microarreglo. Para obtener los valores cuantitativos de cada una de las señales de fluorescencia, se requiere del análisis de las imágenes. Existen comercialmente programas de cómputo para estos fines, o se pueden obtener en sitios de software libre (Ramírez *et. al.*, 2003).

Se debe considerar la aplicación de un filtro para depurar la imagen de pequeñas imperfecciones o señales no deseadas que pudieran encontrarse entre las muestras. También se genera una retícula en la que se definen las áreas que se van a cuantificar para determinar la zona de exclusión y el área para calcular la señal de fondo de la imagen. Definidos estos parámetros, el programa calcula la densidad de los puntos fluorescentes (píxeles) en cada área definida, dando como resultado una tabla con las coordenadas, los valores de densidad, fondo y señal para cada una de las muestras en el microarreglo. Esta información se complementa con las bases de datos en donde se localiza el nombre del gen, su función, la vía metabólica a la que pertenece, ubicación celular, etc. También se requiere del análisis estadístico para identificar entre los miles de datos que se obtienen, aquéllos que son significativos y que representan un cambio real (Ramírez *et. al.*, 2003).

Justificación

La salinización progresiva de las tierras irrigadas es uno de los problemas principales para la agricultura a nivel mundial, y ha sido objeto de intensa investigación, con la mira a largo plazo de desarrollar plantas con mayor tolerancia a la salinidad mediante ingeniería genética. Un enfoque importante ha sido la comprensión de los mecanismos de tolerancia salina de los organismos eucariontes que son halotolerantes por naturaleza. Los ambientes con altas concentraciones de sales evitan el crecimiento de la mayoría de los organismos, pero hay algunos especialmente adaptados que pueden crecer en concentraciones extremadamente altas de sal (Petrovic *et. al.*, 2002).

Las levaduras son excelentes modelos para el estudio de los mecanismos de tolerancia al estrés salino, particularmente porque se ha demostrado que los hongos y plantas superiores no sólo tienen sistemas de transporte iónico similares en sus membranas plasmáticas, sino también porque comparten mecanismos de detoxificación catiónica y vías de señales transductoras (Posas *et. al.*, 2000).

Aunque los grupos de investigación han utilizado a *S. cerevisiae* como el sujeto experimental para definir los cambios en la expresión de genes ante condiciones de salinidad elevada, es importante considerar la identificación de los genes responsables de la tolerancia a altas salinidades en *D. hansenii*, pues es una levadura naturalmente halófila que puede proporcionar información valiosa para un mejor entendimiento de los mecanismos involucrados, con el objetivo de transferir eventualmente esos genes a las plantas. Dado que no existe todavía una biblioteca genómica ordenada de *D. hansenii*, se inició este trabajo con la idea de utilizar la biblioteca ya existente de *S. cerevisiae*, partiendo desde definir las homologías encontradas entre los dos genomas y utilizando el sistema de microarreglos, en este caso heterólogo.

Hipótesis

Al no disponer de la biblioteca genómica de la levadura marina *D. hansenii* para estudiar su expresión genética en diferentes condiciones de salinidad mediante la fabricación de microarreglos de DNA, en este trabajo se utilizarán los microarreglos de otra levadura relacionada filogenéticamente con *D. hansenii*, *S. cerevisiae*. Con esta propuesta se espera el reconocimiento de aquellas secuencias del genoma de *D. hansenii* que sean homólogas con *S. cerevisiae* e hibridizen en sus microarreglos; para poder estudiar los cambios en la expresión genética de *D. hansenii* en 0.6, 1.2 y 2.0 M de NaCl. De funcionar este sistema heterólogo, se espera identificar un grupo de genes cuyo nivel de expresión varíe, tanto en represión como en sobre-expresión, al someter a la levadura en las tres concentraciones de NaCl; y que este cambio vaya en aumento conforme aumente la concentración de NaCl evaluada.

Objetivo General

- Estudiar la expresión genética en la levadura marina *D. hansenii* en diferentes condiciones de salinidad, utilizando el sistema de microarreglos de DNA y el genoma de *S. cerevisiae*.

Objetivos Particulares

- Definir si el sistema de microarreglos heterólogo puede ser una herramienta confiable para el estudio de la expresión genética en *D. hansenii*.
 - Definir los genes de *D. hansenii* que se comparten con *S. cerevisiae*.
 - Determinar los genes cuya expresión se modifica en *D. hansenii* en presencia de sal.
 - Identificar con estos genes las vías metabólicas relacionadas con la salinidad.
-

Metodología

Diseño experimental

Se utilizaron los microarreglos de DNA para estudiar la expresión genética en *D. hansenii*, fabricados a partir de la biblioteca genómica de *S. cerevisiae* disponible en la Unidad de Microarreglos de DNA del Instituto de Fisiología Celular UNAM, partiendo de la base de que ambas levaduras pertenecen a la clase Hemiascomiceta, y a las homologías encontradas entre ellas por Lépling y colaboradores (2000).

El diseño experimental consistió en estudiar el efecto de tres concentraciones de NaCl: 0.6, 1.2, y 2.0 M, sobre la expresión de los genes de *D. hansenii*. Aunque el hábitat normal de esta levadura es el agua de mar, se tomó al medio YPD (que contiene una cantidad pequeña de sales) como eje de comparación para las demás concentraciones. Se seleccionó la concentración de 0.6 M de NaCl debido a que es la concentración de sales en el agua de mar (aunque la de NaCl es de alrededor de 0.5 M), y 1.2 y 2.0 M se escogieron pensando en que al aumentar la concentración en el medio de cultivo podría aumentar el número de cambios en la expresión de los genes en comparación con los genes expresados en 0.6 M, pues ambas concentraciones representan mayor estrés para la levadura. Es posible que mediante la concentración de 0.6 M se observen aquellos genes involucrados en la adaptación de la levadura a vivir en condiciones de alta salinidad y no genes de respuesta a estrés, que probablemente se observen en 1.2 y 2.0 M.

Otro elemento a considerar fue el tiempo de cultivo o exposición de las levaduras a las condiciones seleccionadas; se pensó en estudiarlas durante un período de adaptación, identificado como la fase logarítmica de crecimiento, en la que estén no sólo realizando sus funciones básicas, sino además estén reproduciéndose activamente. Además es en esta fase, donde hay una mayor

síntesis de RNA (factor importante que se tomó en cuenta para el aislamiento de dicha molécula para su hibridación en los microarreglos).

Con el establecimiento de las condiciones de cultivo de la levadura, se decidió el camino para hibridar las muestras en cada microarreglo. Se hicieron 5 microarreglos de *S. cerevisiae* hibridados según las siguientes condiciones (a cada uno le antecede un número con el que podrá ser identificado en la sección de “marcado y purificación de las muestras”):

1. DNA genómico de *D. hansenii* cultivada en medio YPD sin sal.
2. DNA genómico de *D. hansenii* cultivada en medio YPD sin sal vs. DNA genómico de *S. cerevisiae* cultivada en medio YPD sin sal.

En los microarreglos convencionales, se hibridizan dos muestras de una misma especie, sobre el microarreglo de esta misma; el objetivo de estos microarreglos consistió en probar si este tipo de experimento era capaz de funcionar bajo la competencia entre especies heterólogas. En ambos casos, la reacción de hibridación se llevó a cabo a partir del DNA genómico y no del RNA mensajero, como en los microarreglos convencionales; para de esta manera facilitar el desarrollo de la hibridación que ya en principio era difícil.

El primer microarreglo fue un experimento control; ya que el nivel de expresión de los genes de *D. hansenii* en esta condición (sin NaCl) fue comparado con los niveles presentes en las tres concentraciones de NaCl de los microarreglos 3, 4 y 5. Además, el DNA en este microarreglo, fue digerido con la enzima de restricción *Sau 3A* para que al tener fragmentos pequeños, estos hibridaran con las secuencias homólogas del genoma de *S. cerevisiae* con mayor facilidad que si estuviera completo.

3. RNA mensajero de *D. hansenii* cultivada en medio YPD sin sal vs. RNA mensajero de *D. hansenii* cultivada en medio YPD con 0.6 M de NaCl.
4. RNA mensajero de *D. hansenii* cultivada en medio YPD sin sal vs. RNA mensajero de *D. hansenii* cultivada en medio YPD más 1.2 M de NaCl.

5. RNA mensajero de *D. hansenii* cultivada en medio YPD sin sal vs. RNA mensajero de *D. hansenii* cultivada en medio YPD más 2.0 M de NaCl.

Como los resultados obtenidos a partir de los microarreglos 1 y 2 validaban el hecho de trabajar con especies diferentes, los microarreglos 3, 4 y 5 se hicieron a partir de RNA mensajero, para observar cambios en la expresión de los genes en las tres concentraciones. En estos microarreglos se comparó el nivel de expresión de los genes de *D. hansenii* cultivada sin NaCl (YPD), con los niveles presentes en cada concentración de NaCl.

Para el análisis de los genes que hibridaron en estos microarreglos se tomó en cuenta que estos mismos genes hubieran hibridado en el microarreglo número uno donde se utilizó solamente el DNA genómico de *D. hansenii*, con la finalidad de comprobar la veracidad de los cambios ocurridos bajo las tres concentraciones de NaCl. Dicho de otra manera, se buscó en el primer microarreglo, el gen que presentó el cambio en su expresión en cada uno de los microarreglos hibridados con RNA y se comprobó si hibridó en el primer microarreglo. De ser así el gen se tomó en cuenta como resultado positivo. Por el contrario si el gen no hibridó en el primer microarreglo se eliminó por ser un falso positivo pues si no hibridó en ese microarreglo fue por falta de suficiente similitud a nivel de DNA genómico y sería imposible que su RNA mensajero fuera reconocido en o en los microarreglos con RNA. Otro de los criterios utilizados para descartar la presencia de falsos positivos, fue que el duplicado de cada gen, seleccionado por los métodos estadísticos descritos en la metodología, tuviera el mismo comportamiento que su gen correspondiente.

Descripción, cultivo y mantenimiento de las cepas utilizadas

D. hansenii: La cepa de *D. hansenii* utilizada fue la Y7426 (US Department of Agriculture Peoria, IL.) donada por la Dra. Patricia Thomé Ortiz (ICMyL). La

levadura se cultivó en medio YPGAL sólido más 1 M de NaCl durante 36 horas de incubación a una temperatura de 30° C, para evitar la contaminación del cultivo con la presencia de otros microorganismos que en esta concentración de NaCl no pueden crecer. Después de su crecimiento, se conservó en refrigeración a 4° C. Para el aislamiento del RNA total, las células se cultivaron en medio YPD líquido sin sal y con 0.6, 1.2, y 2.0 M de NaCl, según el microarreglo.

S. cerevisiae: La cepa de *S. cerevisiae* utilizada fue donada por la Unidad de Microarreglos de DNA, IFC UNAM. La levadura se cultivó durante 24 horas de incubación en medio YPD sólido a una temperatura de 30° C. Después de su crecimiento se conservó en refrigeración a 4° C para su mantenimiento. Para el aislamiento del RNA total, las células se cultivaron en medio YPD líquido sin sal.

Aislamiento de DNA genómico

En los microarreglos hibridizados con DNA genómico se utilizó DNA genómico que se extrajo de ambas levaduras cultivadas en medio YPD sólido durante 36 horas, a 30° C. El aislamiento se hizo mediante la técnica de Hoffman y Winston (1987) con una modificación: en lugar de cultivar a las células en medio YPD líquido, se cultivaron en medio YPD sólido. Para comprobar la calidad del aislamiento se corrió un gel de agarosa al 1%. La enzima de restricción *Sau 3A* con la que se digirió el DNA genómico de *D. hansenii* (incubación a 37° C durante 15 a 20 minutos) reconoce la secuencia de 4 pares de bases GATC/CTAG produciendo fragmentos con extremos monocatenarios adhesivos sobre el extremo 5' de cada hebra. Esta enzima fue donada por el Dr. Roberto Coria, IFC-UNAM.

Curvas de crecimiento

Para aislar el RNA total utilizado en los microarreglos hibridizados con RNA mensajero, fue necesario que los cultivos celulares se encontraran en la fase de

crecimiento exponencial. Para lograrlo se hicieron curvas de crecimiento de *D. hansenii* en ausencia de sal y con 0.6, 1.2 y 2.0 M de NaCl y de *S. cerevisiae* crecida en ausencia de sal. Para ello se sembró a *D. hansenii* (del medio YPGAL sólido más 1 M de NaCl) en matraces con 50 ml de medio YPD líquido sin sal y con las tres concentraciones de NaCl, y se dejó crecer durante 24 horas a 30° C con una agitación constante de 250 r.p.m. (preinóculos). Pasado el tiempo se tomaron alícuotas de los preinóculos (100 µl) y se diluyó 1:10, se leyeron en el espectrofotómetro y con la densidad óptica obtenida se hicieron cálculos para obtener el volumen necesario a inocular para iniciar los cultivos en 0.1 unidades de densidad óptica a 600 nm. Con el volumen obtenido se inocularon matraces con 100 ml de medio YPD líquido sin sal y con las tres concentraciones de NaCl durante 36 horas a 30° C con agitación constante a 250 r.p.m. (inóculos), muestreando cada 2 horas. En *S. cerevisiae* se llevó a cabo el mismo procedimiento pero solo con medio YPD líquido sin sal.

Aislamiento de RNA total

El aislamiento del RNA total se llevó a cabo mediante la técnica de fenol caliente con la asesoría del M en IBB Simón Guzmán (Unidad de Microarreglos de DNA, IFC UNAM). El aislamiento se hizo a partir de cultivos de *D. hansenii* en 100 ml de medio YPD sin sal y con 0.6, 1.2 y 2.0 M de NaCl, en fase de crecimiento exponencial o a 0.6 unidades de densidad óptica. Para comprobar la calidad del aislamiento, se corrió un gel de agarosa/formaldehído al 1%.

Impresión de los microarreglos

Los microarreglos fueron impresos por el personal de la Unidad de Microarreglos de DNA IFC UNAM. Las bibliotecas de los marcos de lectura abierta (ORFs) de Research Genetics de la levadura *S. cerevisiae* se resuspendieron en 0.2 µg/µl de una solución Micro Spotting (Telechem Internacional Inc.). Las laminillas de 25X75 cubiertas por superamina (TeleChem

Internacional INC) fueron impresas por duplicado y fijadas a 80° C durante 24 horas. Para obtener información acerca de la posición de cada gen en el microarreglo se puede consultar la base de datos de *S. cerevisiae* disponible en la Unidad de Microarreglos.

Prehibridación de los microarreglos

Para la prehibridación, los microarreglos se rehidrataron con vapor de agua a 60° C durante 10 segundos y se fijaron con luz UV a 1200J (30 seg.) en dos ocasiones. Las laminillas entrecruzadas se incubaron en agua hirviendo durante 2 minutos, se lavaron con 95 % de etanol durante un minuto y se prehibridizaron en 5X SSC, 0.1 % SDS y 1 % BSA durante una hora a 42° C.

Marcado y purificación de las muestras

Las muestras o sondas se marcaron con el kit de CyScribe (Amersham) "First-Strand cDNA labeling kit" como se muestra en la Tabla 2. La incorporación de la marca se analizó en el espectrofotómetro midiendo la absorbencia a 555 nm para Cy3 (rojo) y 655 nm para Cy5 (azul) y se verificó mediante un gel de poliacrilamida observando la fluorescencia emitida por los fluoróforos incorporados en el cDNA (fundamento mencionado en la introducción) en el Typhoon. Una vez comprobada la incorporación, la reacción se purificó con una columna Qiagen (QIA quick PCR purification kit) Cy5 y los productos de la purificación se resuspendieron en agua destilada estéril para su hibridación.

Hibridación y lavado de los microarreglos

Los microarreglos se hibridaron con cantidades iguales de cDNA marcado según las condiciones mencionadas (Tabla 2) adicionando solución de hibridación HyBIT2 (TeleChem Internacional Inc.). Se dejaron incubar por más de 12 horas a 45° C, se lavaron y se secaron por 48 horas para su lectura.

Tabla 2: Marcaje de las sondas en cada microarreglo.

MICROARREGLO	SONDA	FLUORÓFORO
1	<i>D. hansenii</i> sin sal	Cy3
2	<i>S. cerevisiae</i> sin sal	Cy3
	<i>D. hansenii</i> sin sal	Cy5
3	<i>D. hansenii</i> sin sal	Cy3
	<i>D. hansenii</i> 0.6 M NaCl	Cy5
4	<i>D. hansenii</i> sin sal	Cy3
	<i>D. hansenii</i> 1.2 M NaCl	Cy5
5	<i>D. hansenii</i> sin sal	Cy3
	<i>D. hansenii</i> 2.0 M NaCl	Cy5

Cuantificación de los microarreglos

La obtención, registro y cuantificación de las imágenes obtenidas a partir de los microarreglos se realizaron en el escáner ScanArray 4000 y el programa de cómputo ScanArray 4000 de Packard BioChips. Todas las imágenes se capturaron con una ganancia del fotomultiplicador del 60 % (para multiplicar la señal de la fuente de luz representada por la fluorescencia en el microarreglo), una intensidad del láser de 70 a 75 %, 10 μm de resolución a un valor de barrido de 50 % para el escaneo de las imágenes. La densidad (D), ruido de fondo

(background) (*B*), señal (*S*), y diámetro de cada mancha (*I*) se calcularon con el programa de cómputo ArrayPro Analyzer de Media Cybernetics. La *D* se refiere a la densidad de fluorescencia que emite la hibridación en el microarreglo (mancha o spot), *B* es la emisión basal que hay alrededor de la mancha, y la señal *S* es la división entre la *D* y la *B*. Se seleccionaron aquellas señales, en Cy3 y Cy5, cuya división de D_{Cy3} entre B_{Cy5} (de cada mancha) fuera \geq a la división de $D_{promedio}$ entre $B_{promedio}$. El tamaño de cada mancha se seleccionó con base en que los diámetros de Cy3 y Cy5 cumplieran lo siguiente: \geq a 0.9 y \leq 1.1.

En las imágenes de los microarreglos, que se muestran en la sección de resultados (Figuras 5, 6, 9, 10 y 11), se observan diferentes coloraciones que representan los niveles de expresión genética bajo las condiciones de NaCl evaluadas. Los puntos en color rojo representan genes expresados sólo en *D. hansenii*; los de color verde representan genes expresados solamente en *S. cerevisiae*; y por último, los puntos de color amarillo, representan genes expresados en ambas levaduras. Estas imágenes fueron obtenidas por la Unidad de Microarreglos de DNA del IFC UNAM.

Para la selección de los genes sobre-expresados y reprimidos se obtuvo el Log_2 de la señal de Cy3, Cy5 para cada mancha. Los genes sobre-expresados se seleccionaron siempre y cuando el $\text{Log}_2 (S_{Cy3}/S_{Cy5})$ era > 0.6 (1.5 veces más), y los genes reprimidos si el $\text{Log}_2 (S_{Cy3}/S_{Cy5})$ era < -0.6 (1.5 veces menos). También se calcularon el promedio y la desviación estándar de ambas señales y sólo se seleccionaron aquellas manchas cuyo promedio fuera dos veces la desviación estándar.

PCR

La reacción en cadena de la polimerasa ó PCR (traducido al español por sus siglas en inglés) se desarrolla: 1) separando las dos cadenas del DNA que se quiere amplificar (en este caso, el DNA genómico de *D. hansenii*), pues cada una actúa como molde para fabricar su complementaria; 2) unión de los

cebadores de *D. hansenii* a su región específica dentro de la cadena de DNA; y por último 3) generación de la cadena de DNA complementaria por acción de la DNA polimerasa. De esta manera cada una de las moléculas de DNA hijas pueden volver a entrar en el proceso y servir como molde para fabricar más copias.

El PCR se hizo para amplificar las regiones en donde se localizaron los genes seleccionados en el microarreglo hibridizado con RNA mensajero de *D. hansenii* cultivada en medio YPD sin sal y con 2.0 M de NaCl. Las condiciones de amplificación fueron: H₂O estéril, 4 µl de MgCl₂ 1 mM (Stock 25 mM), 5 µl de Buffer 1X (10X), 1 µl de la mezcla de dNTPs (0.8 mM), 1 µl TAQ polimerasa, oligonucleótidos con sentido río arriba (forward) y río abajo (reverse) diseñados en la Unidad de Biología Molecular del IFC UNAM (2.1 µg/µl), y 1 µl de DNA genómico de *D. hansenii* cultivada en YPD sin sal, o con 0.6, 1.2 ó 2.0 M de NaCl y DNA genómico de *S. cerevisiae* cultivada en YPD sin sal, para un volumen final de 50 µl. La primera etapa de desnaturalización se llevó a cabo a 92° C durante 5 minutos; la segunda etapa de desnaturalización, que se repitió en cada ciclo, fue a 92° C durante 30 segundos; la formación de híbridos de cebador con templado se llevó a cabo a 54° C durante 45 segundos; y la polimerización a 72° C durante 90 segundos. Las últimas tres condiciones se repitieron 30 veces. La última etapa de extensión fue a 72° C durante 5 minutos. Los productos de la amplificación se separaron en un gel de agarosa al 1 %.

RT/PCR

Se llevó a cabo un ensayo transcriptasa inversa/reacción en cadena de la polimerasa ó RT/PCR (traducido al español por sus siglas en inglés) para comprobar por un método diferente los cambios de expresión obtenidos a partir del microarreglo hibridizado con RNA mensajero de *D. hansenii* crecida en medio YPD sin sal y con 2.0 M de NaCl. Con este método, la enzima

transcriptasa inversa, sintetiza cDNA a partir del RNA mensajero, y este cDNA sirve de templado para la reacción de PCR. Los RNAs se trataron con DNAsa para eliminar el DNA genómico: 1 μ l de buffer 10X, H₂O con dietilpirocarbonato (DEPC), 3 μ l de RNA, 1 μ l de la enzima deoxirribonucleasa I (Invitrogen), para un volumen final de 10 μ l. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, se agregó 1 μ l de EDTA 25 mM se incubó a 65° C durante 10 minutos. Volumen final de la reacción 11 μ l.

Con estos RNAs (2 μ l) se llevó a cabo el RT/PCR con el kit de SuperScript (Invitrogen) "RT-PCR Platinum ® Taq en un solo paso" para un volumen final de 50 μ l. Se repitió el mismo procedimiento pero con los RNAs sin el tratamiento con la DNasa. Ambas reacciones se llevaron a cabo de la siguiente manera: RT, 45° C durante 30 minutos y 92° C durante 2 minutos; PCR, el ciclo de amplificación que se empleó fue a 92° C durante 15 segundos, 54° C durante 30 segundos y 72° C durante 90 segundos. Este ciclo se repitió 20 veces. Después, se bajó la temperatura a 25° C durante 5 minutos, para tomar una alícuota de 10 μ l. Se repitió nuevamente la etapa de síntesis pero en esta ocasión sólo 10 veces y se bajó la temperatura a 25° C durante 5 minutos para tomar la segunda alícuota de 10 μ l. La última etapa de extensión fue a 72° C durante 5 minutos. La amplificación se corrió en un gel de agarosa al 1 %. Finalmente se repitió 10 veces la etapa de síntesis, y los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1 %.

Programas de cómputo

El programa utilizado para obtener las secuencias de los genes de *S. cerevisiae* fue el de la base de datos del genoma de *Saccharomyces* disponible en: <http://www.yeastgenome.org/>. Esta base de datos de la biología molecular y genética de *S. cerevisiae*, fue creada por la Universidad de Stanford y contiene información de la secuencia completa del genoma de esta levadura. Para obtener el porcentaje de identidad entre los genes de *S. cerevisiae* y *D.*

hansenii se utilizó la comparación por el programa blast del proyecto “Génolevures” disponible en: <http://cbi.labri.fr/Genolevures/>. Este proyecto fue creado para hacer genómica comparativa en gran escala entre *S. cerevisiae* y 14 especies representativas de la clase Hemiascomiceta, entre las que se encuentra *D. hansenii*. Para el diseño de los oligonucleótidos específicos para *D. hansenii* utilizados en el PCR se usó el programa GCG (por sus siglas en inglés Gene Computing Group) para optimizar la selección y localización de los cebadores. Este programa genera un listado jerárquico de cebadores específicos y calcula las temperaturas medias, así como su porcentaje de GC y demás características necesarias para el desarrollo óptimo del PCR, que nos permitió seleccionar los cebadores idóneos para nuestros objetivos. Por último, para la localización de los genes sobre-expresados dentro de las vías metabólicas se utilizó la enciclopedia de los genes y genomas 2 de Kioto, disponible en la red en: <http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>.

Resultados

El primer paso consistió en establecer las condiciones precisas para el aislamiento del DNA genómico de las levaduras *D. hansenii* y *S. cerevisiae*, para la obtención de un DNA de excelente calidad, requerido para los microarreglos. En la Fig. 4 se observan diferentes muestras de DNA aisladas mediante la técnica modificada de Hoffman y Winston (1987), descrita anteriormente en la metodología. Con esta técnica se logró obtener una gran cantidad de DNA puro que se utilizó en la fabricación de los microarreglos hibridizados con DNA genómico.

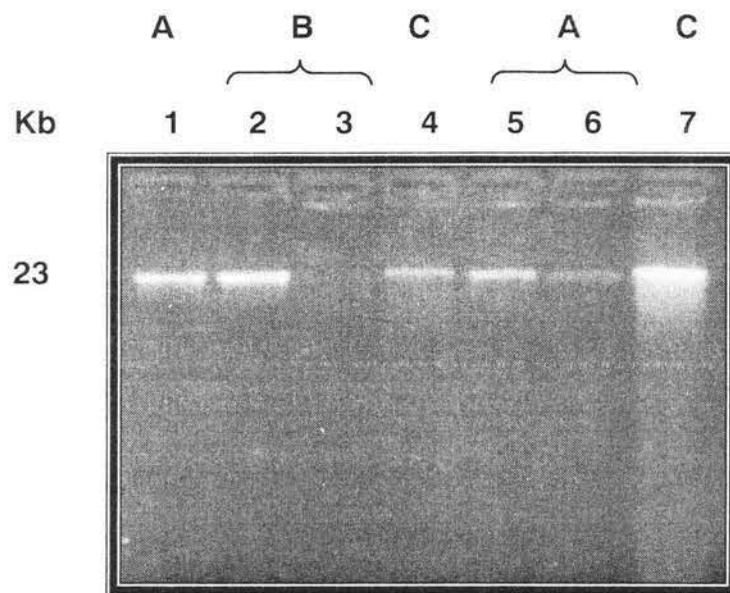


Figura 4. Electroforesis del DNA genómico de *D. hansenii* y *S. cerevisiae*. Gel de agarosa al 1%. 10 μ l de muestra. DNA de: *D. hansenii* (Carril 1, 2, 3 y 4); y de *S. cerevisiae* (Carril 5, 6 y 7). Aislamiento del DNA de las muestras en los carriles 1, 5 y 6, el día 18 de febrero de 2003 (A); carriles 2 y 3, el 7 de febrero de 2003; y carriles 4 y 7, el 22 de marzo de 2004 (C). No se aisló DNA genómico en la muestra del carril 3.

Las diferentes intensidades de las bandas (Fig. 4) indican la cantidad de DNA aislado; a mayor intensidad, mayor es la cantidad de DNA obtenido. La mayor cantidad se observa en el carril 7, y la menor cantidad en el carril 6. Estas diferencias se deben a que el DNA se aisló de diferentes cultivos celulares y de diferentes días (pero de la misma cepa), y aunque se utilizaron los mismos reactivos y la misma metodología, las condiciones de cultivo pudieron no ser iguales afectando el crecimiento de las células. El que no se haya aislado DNA en la muestra del carril 3 puede deberse a un error en la técnica o a la poca cantidad de células obtenidas en el cultivo previo.

En la Figura 5 se observa la imagen del microarreglo hibridizado con DNA de *D. hansenii* cultivada sin sal, y puede apreciarse el gran número de genes homólogos entre ambas levaduras. Del análisis de esta imagen, mediante las herramientas descritas en la metodología, se obtuvieron 3117 genes que hibridaron en el microarreglo de *S. cerevisiae* de un total de 6017.

En la Figura 6 se observa la imagen del microarreglo hibridizado con el DNA de las levaduras *D. hansenii* y *S. cerevisiae* cultivadas sin sal. En esta imagen se detectaron aquellos genes con tal semejanza con *S. cerevisiae* como para ser reconocidos por el microarreglo al competir con los genes del propio genoma de *S. cerevisiae*. Se observa a simple vista que la hibridación de los genes es menor (número de puntos rojos) en comparación con los resultados obtenidos en el microarreglo anterior (Fig. 5). Sin embargo, aún en estas condiciones, el microarreglo reconoció 251 secuencias de *D. hansenii* capaces de hibridar con las de *S. cerevisiae* aun en presencia del DNA de ésta última.

Se obtuvo también el porcentaje de identidad de los 251 genes de *S. cerevisiae* con sus homólogos en *D. hansenii* (las secuencias de los 251 genes obtenidas a partir del microarreglo heterólogo pertenecen a genes de *S. cerevisiae*), para obtener un indicador del grado de reconocimiento que puede ofrecer un microarreglo heterólogo bajo las condiciones estudiadas. Para ello se hizo una comparación entre las secuencias de *S. cerevisiae* (obtenidas en la

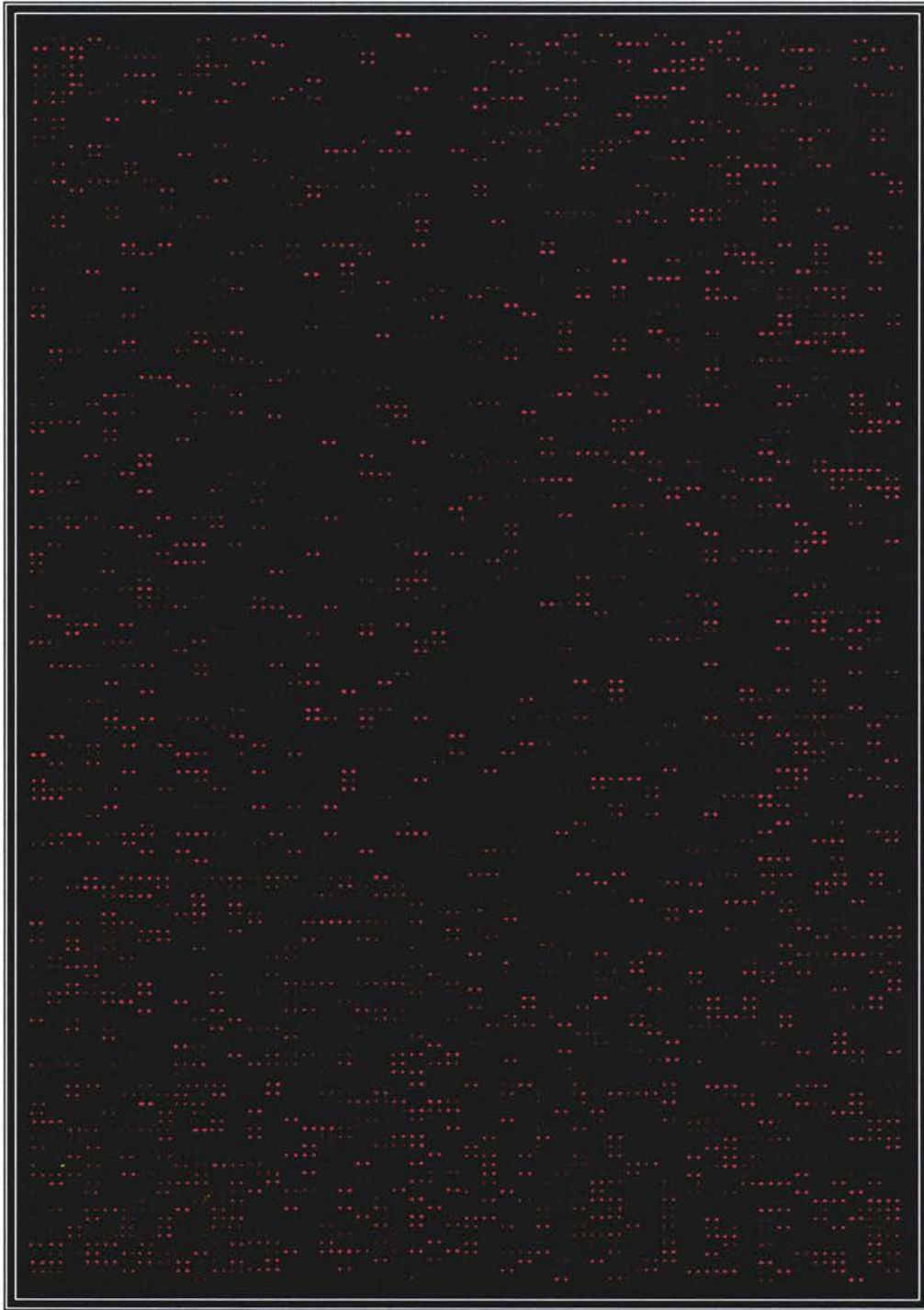


Figura 5. Imagen del microarreglo de *S. cerevisiae* hibridizado con DNA genómico de *D. hansenii* cultivada en medio YPD sin sal (Cy3).



Figura 6. Imagen del microarreglo de *S. cerevisiae* hibridizado con DNA genómico de *S. cerevisiae* cultivada en medio YPD sin sal (Cy3) vs. DNA genómico de *D. hansenii* cultivada en medio YPD sin sal (Cy5).

base de datos del genoma de *Saccharomyces*) y las secuencias de *D. hansenii* (obtenidas en la base de datos de "Génolevures"), a través del programa BLAST disponible en el proyecto de "Génolevures". Los resultados mostraron que para que un microarreglo heterólogo funcione necesita de un 85 a 28 % de identidad entre las secuencias de las dos especies a competir.

El segundo paso consistió en establecer las condiciones precisas para el aislamiento del RNA total de *D. hansenii*. Para llevar a cabo este objetivo, se obtuvieron sus curvas de crecimiento (Fig. 7) en las que se cultivó a esta levadura sin sal y con 0.6, 1.2 y 2.0 M de NaCl. En estas curvas se observa que las células tuvieron diferentes velocidades de crecimiento y lo importante fue que se identificó el momento en el que las células, cultivadas en cada una de las concentraciones de NaCl, alcanzaban la fase de crecimiento exponencial (0.6 unidades de densidad óptica) para llevar a cabo el aislamiento de RNA.

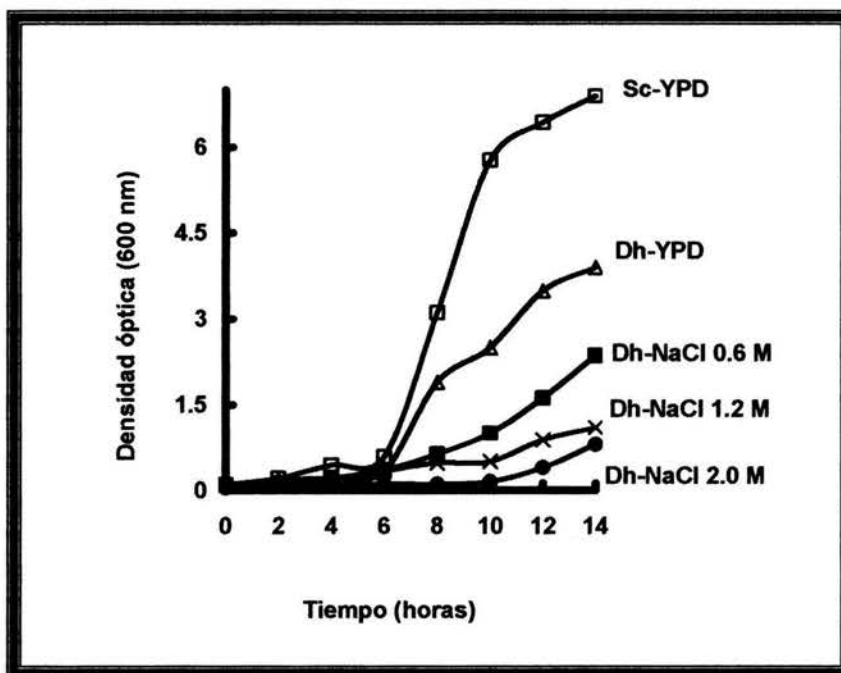


Figura 7. Crecimiento de *S. cerevisiae* (control) y *D. hansenii* en diferentes concentraciones de NaCl.

En la Figura 8 se observa que se logró obtener una gran cantidad de RNA total de *D. hansenii*. Las bandas localizadas por arriba de la banda ribosomal grande (28S) representan el DNA genómico de las muestras que no pudo ser eliminado durante la técnica y que no genera problemas para la hibridación en los microarreglos. Las diferentes intensidades en las bandas indican la cantidad aislada, a mayor intensidad mayor cantidad de RNA. Existe una gran diferencia entre la cantidad de RNA de la muestra en el carril 6 y la cantidad de las muestras en los carriles 1 al 5, que se debe a que el RNA total en el carril 6 se aisló de un cultivo celular de un día diferente al del día en que se hicieron los cultivos de donde se aislaron las muestras de los carriles 1 al 5.

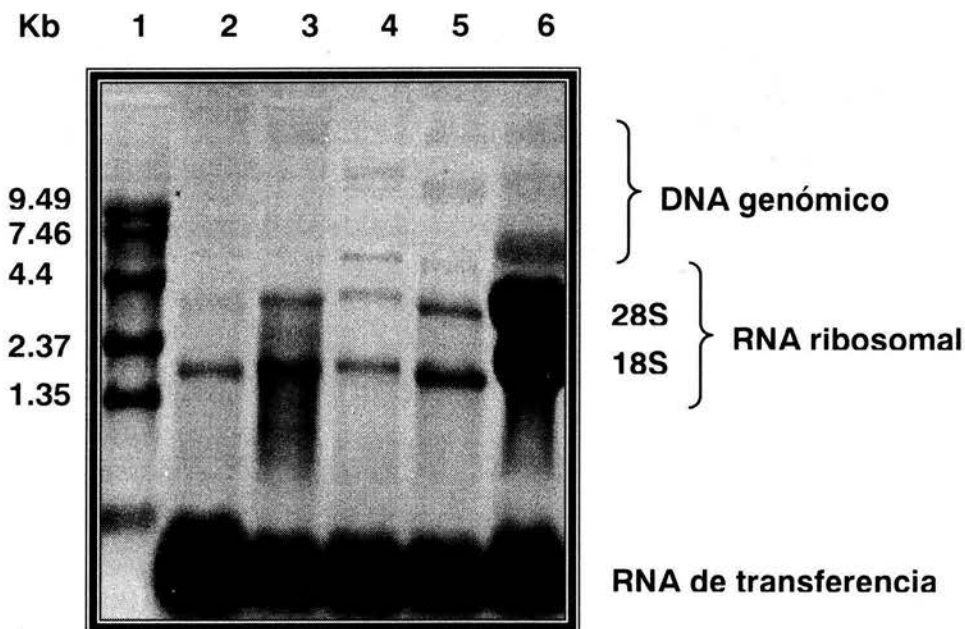


Figura 8. Electroforésis del RNA total de *D. hansenii* en diferentes concentraciones de NaCl. Gel de agarosa al 1% y formaldehído. 3 μ l de muestra. Indicador de peso molecular (Carril 1), RNA total de *S. cerevisiae* como control (Carril 2), de *D. hansenii* sin sal (Carril 3), con 0.6 (Carril 4), 1.2 (Carril 5) y 2.0 M de NaCl (Carril 6). Los RNAs de los carriles 3, 4, 5 y 6, provienen de cultivos de un mismo día; y el RNA del carril 6, de un cultivo de un día diferente.

El siguiente paso consistió en la elaboración de los microarreglos hibridizados a partir de los RNAs descritos anteriormente. Las imágenes se muestran en las Figuras 9 a 11, y corresponden respectivamente a las concentraciones de 0.6, 1.2 y 2.0 M de NaCl. En todos los casos, el experimento refleja la comparación, o competencia, entre el RNA de las células cultivadas en YPD sin sal contra las células cultivadas en las tres concentraciones de sal con el fin de definir qué genes se expresan más y cuáles menos. En las imágenes puede apreciarse a simple vista que hay algunos genes que se expresan más y genes que se reprimen, así como también que a mayor concentración de sal, mayor es el número de cambios en la expresión de los genes tanto en sobre-expresión como en represión.

El número de falsos positivos encontrados en estos microarreglos (según los criterios descritos en la metodología) fue el siguiente: en el microarreglo con 0.6 M (Fig. 9) se descartaron 550 genes (253 reprimidos y 297 sobre-expresados), en el microarreglo con 1.2 M (Fig. 10) se descartaron 428 genes (282 reprimidos y 146 sobre-expresados), y en el microarreglo con 2.0 M (Fig. 11) se descartaron 683 genes (495 reprimidos y 188 sobre-expresados). Puede verse en la Tabla 3 el conteo de los genes que se sobre-expresaron o se reprimieron en cada concentración de sal. El número de genes en ambos casos aumentó a medida que las células crecieron en un medio con mayor concentración de NaCl, confirmando lo que a simple vista se aprecia en las imágenes de los microarreglos (Figs. 9, 10 y 11). El número de genes reprimidos fue mayor que el de los genes sobre-expresados en las tres concentraciones de NaCl. Entre 4 y 15 % del genoma de *D. hansenii* respondió a las diferentes concentraciones de sal. Dado que en 2.0 M de NaCl se observaron los mayores cambios de expresión, se escogió este microarreglo para realizar los análisis más finos de este trabajo. De aquí en adelante se presentarán los resultados y el análisis del comportamiento de los genes sobre-expresados a esta concentración, lo relacionado con los genes reprimidos será motivo de trabajo posterior.

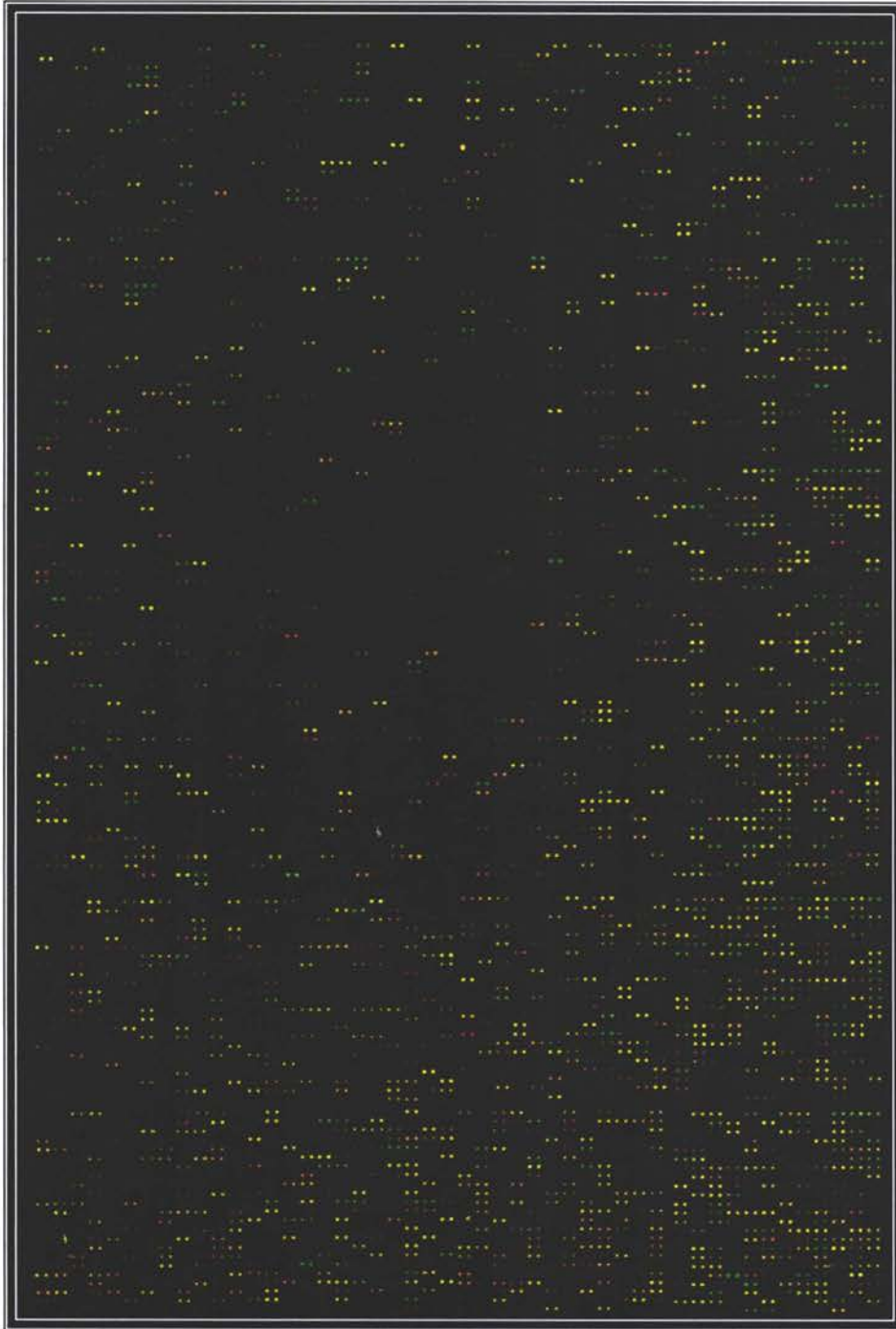


Figura 9: Imagen del microarreglo de *S. cerevisiae* hibridizado con RNA total de *D. hansenii* cultivada en YPD sin sal (Cy3) vs. RNA total de *D. hansenii* cultivada en medio YPD más 0.6 M de NaCl (Cy5).

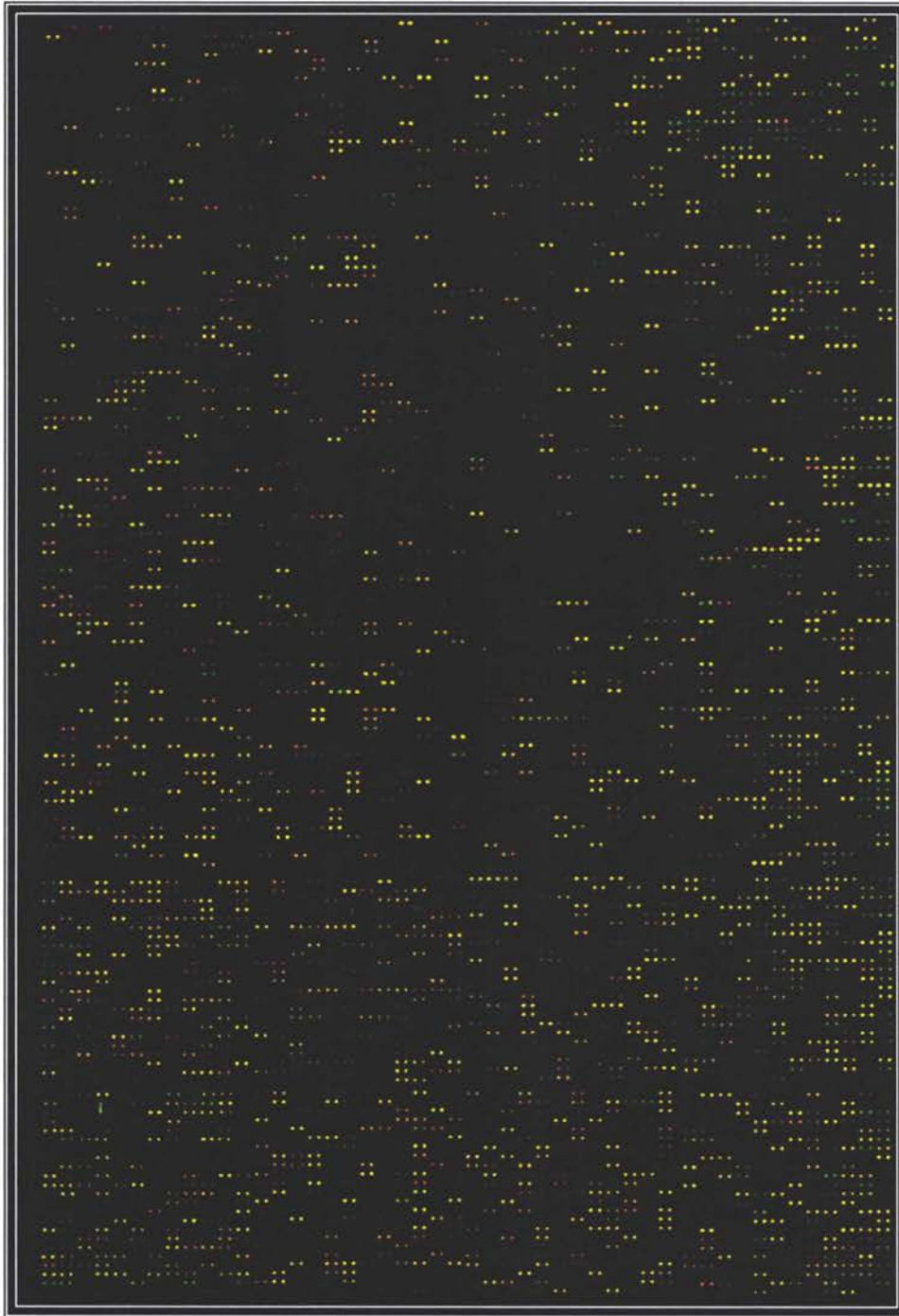


Figura 10. Imagen del microarreglo de *S. cerevisiae* hibridizado con RNA total de *D. hansenii* cultivada en medio YPD sin sal (Cy3) vs. RNA total de *D. hansenii* cultivada en medio YPD más 1.2 M de NaCl (Cy5).

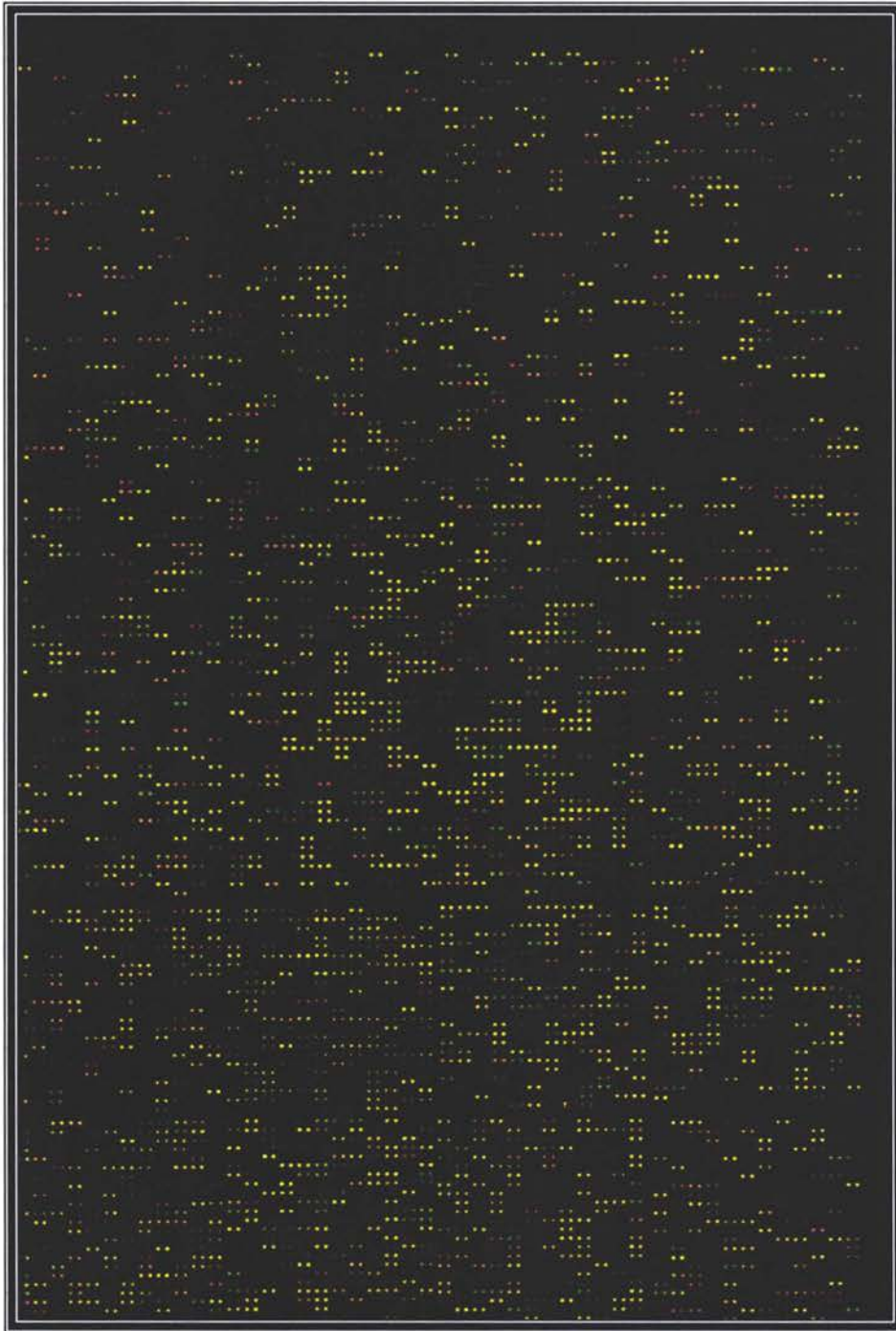


Figura 11. Imagen del microarreglo de *S. cerevisiae* hibridizado con RNA total de *D. hansenii* cultivada en medio YPD sin sal (Cy3) vs. RNA total de *D. hansenii* cultivada en medio YPD más 2.0 M de NaCl (Cy5).

Tabla 3. Números de genes de *D. hansenii* que aumentaron o disminuyeron su expresión en 0.6, 1.2 y 2.0 M de NaCl.

[M NaCl]	0.6	1.2	2.0
GENES TOTALES	6017	6017	6017
GENES SOBRE-EXPRESADOS	45	94	235
GENES REPRIMIDOS	211	324	701
PORCENTAJE DE CAMBIO	4.2	6.9	15.5

La Tabla 5 en el anexo muestra datos sobre los genes sobre-expresados en el microarreglo hibridizado con RNA de *D. hansenii* cultivada sin sal y con 2.0 M de NaCl, y su patrón de expresión en relación con las diferentes concentraciones de sal que se emplearon: empezando en 0.6, siguiendo en 1.2 y llegando a 2.0 M. Se muestra también, para cada gen, el porcentaje de identidad que cada gen tiene con sus homólogos en *D. hansenii*, y la información disponible sobre el proceso biológico y función molecular que realiza (facilitada por la Unidad de Microarreglos de DNA del IFC UNAM).

Se hizo también un estudio más detallado acerca de los procesos metabólicos en los que están involucrados los genes que se sobre-expresaron a 2.0 M de NaCl, con el objetivo de identificar relaciones entre la vía en la que participan y su posible papel en la adaptación de esta levadura a la vida marina. Para ello se utilizó el programa de la “Enciclopedia de los genes y genomas 2 de Kioto” (descrito en la metodología) para ubicar a los 235 genes sobre-expresados (Tabla 3) dentro de las vías metabólicas a las que pertenecen. En la Tabla 4 se observa el agrupamiento de los genes obtenido a partir de este

programa y puede verse que existen genes sobre-expresados que corresponden a varias vías metabólicas a la vez, pero en forma relativamente aislada. Una de las bases de datos que utiliza el programa fue la de *S. cerevisiae*; y la razón por la que algunos genes no pudieron ser ubicados dentro de alguna vía metabólica (el programa no pudo ubicar 184 genes, datos no mostrados), fue que no se conoce aún su función en *S. cerevisiae*.

Llama la atención el hecho de que existen varios genes que pertenecen a una vía de señalización que se relaciona con el estrés osmótico y que codifican para proteínas del tipo de las MAP cinasas, que en *S. cerevisiae* corresponden a algunas involucradas en la respuesta a la alta osmolaridad. Para obtener más información al respecto se utilizó este mismo programa, que despliega también el esquema de la vía metabólica en la que está ubicando cada gen, y colorea de diferentes tonos aquellos genes que se están sobre-expresando y aquellos que se están reprimiendo. El esquema de la Fig. 12 representa las vías de señalización de las MAP cinasas obtenidas a partir de la información de la Tabla 4 y contiene cuatro de las cinco vías de señalización de las MAPK descritas en *S. cerevisiae*: la vía de apareamiento por respuesta a feromona (Pheromone), la vía para establecer la pared de la espora (Hypotonic shock), vía HOG (High osmolarity), y vía de desarrollo pseudohifal (Starvation). Los rectángulos representan los genes que participan en cada una de las vías de señalización y están indicados en color rojo, aquellos genes que se sobre-expresaron en *D. hansenii* a 2.0 M de NaCl, y en color verde, aquellos genes que no sufrieron cambios en su expresión bajo esta condición.

La vía de interés en este trabajo es la vía HOG o de respuesta a alta osmolaridad por glicerol, pues en *S. cerevisiae* se ha visto que estimula la respuesta transcripcional para contrarrestar el estrés causado por cambios en la osmolaridad en su ambiente celular. En el esquema de la Figura 12 se observa que los genes *Sho1* y *Sln1* que forman parte de esta vía y que codifican para proteínas de la membrana plasmática, están sobre-expresados (en color rojo).

Tabla 4: Vías metabólicas en las que participan los genes de *D. hansenii* sobre-expresados a 2.0 M de NaCl.

VÍA METABÓLICA	NÚMERO DE GENES	NOMBRE DE LOS GENES
Biosíntesis ácidos biliares	1	ARE1
Biosíntesis fenilalanina, tirosina y triptofano	1	TRP1
Biosíntesis gangliósidos	1	MNN1
Biosíntesis glicolípidos	1	MNN1
Biosíntesis glicosilfosfatidilinositol	1	MNN1
Biosíntesis keratan sulfatos	1	MNN1
Biosíntesis N-glicanos	4	RAM1, MNN1, CWH41, DPM1
Biosíntesis O-glicanos	1	MNN1
Biosíntesis pantotenato y CoA		PAN6
Biosíntesis ubiquinona	1	RAM1
Ciclo celular	3	CDC47, CHK1, MIH1
Ciclo de Krebs	1	KGD2
Degradación benzoato vía unión CoA	5	CHK1, SAT4, KIN1, YAK1, IPL1

VÍA METABÓLICA	NÚMERO DE GENES	NOMBRE DE LOS GENES
Degradación lisina	1	KGD2
Fosforilación oxidativa	2	NDE2, VMA13
Metabolismo alanina y aspartato	1	ADE12
Metabolismo almidón y sacarosa	10	CHK1, MAL32, SAT4, KIN1, GLC3, BGL2, MUC1, YAK1, FKS3 IPL1
Metabolismo beta-alanina	1	PAN6
Metabolismo esfingolípidos	6	CHK1, SAT4, KIN1, MNN1, YAK1, IPL1
Metabolismo fructosa y manosa	2	MNN1, YER003C
Metabolismo galactosa	3	GAL1, GAL3, MAL32
Metabolismo glicerolípidos	3	MNN1, CKI1, PSD1
Metabolismo glicina, serina y treonina	2	HEM1, PSD1
Metabolismo globósidos	1	MNN1
Metabolismo glutamato	1	GUA1
Metabolismo inositol fosfato	5	CHK1, SAT4, KIN1, YAK1, IPL1

VÍA METABÓLICA	NÚMERO DE GENES	NOMBRE DE LOS GENES
Metabolismo nicotinato y nicotinamida	5	CHK1, SAT4, KIN1, YAK1, IPL1
Metabolismo pirimidinas	2	URA7, RPA190
Metabolismo piruvato	1	ACH1
Metabolismo purinas	4	YSA1, GUA1, ADE12, RPA190
Metabolismo riboflavinas	1	FAD1
Poza carbono por folato	1	FAU1
Proteosoma	1	PRE7
Ribosoma	6	YBL087C, YER117W, RPL9B, YKR057W, RPS29B, RPS28B
RNA polimerasa	1	RPA190
Síntesis de ATP	1	VMA13
Sistema dos componentes	1	SLN1
Vía de pentosas fosfato	2	SOL2, SOL4
Vía de señalización de las MAPK	3	SHO1, GPA1, SLN1
Proteólisis por ubiquitina	3	CDC53, CDC26, HUL4

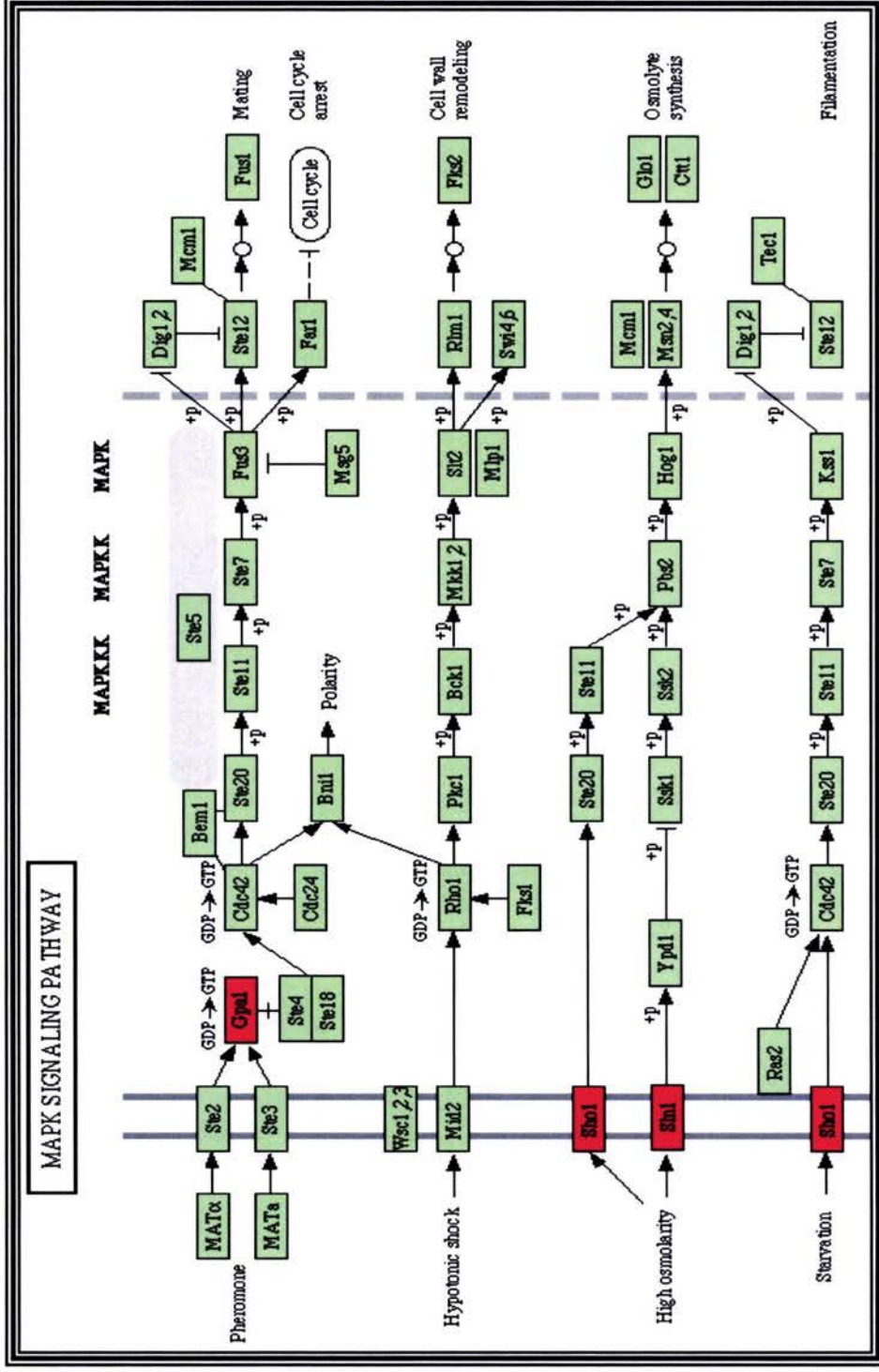


Figura 12. Vías de señalización de las MAPK en *S. cerevisiae* en donde se localizan los genes de *D. hansenii* sobreexpresados a 2.0 M de NaCl (en rojo).

Debido a que en este trabajo se plantea el uso de los microarreglos como una herramienta para el estudio de la expresión génica en *D. hansenii*, mediante el genoma de *S. cerevisiae*, era necesario comprobar a través de otro método la sobre-expresión de algún gen obtenido a partir del microarreglo heterólogo. Entonces se decidió trabajar con los genes que participan en la vía HOG: *Sho1*, *Sln1* (Fig. 12) y el gen *Ssk22*, que no fue localizado por el programa de Kioto pero que la información obtenida a partir del microarreglo indica su sobre-expresión.

Tomando en cuenta el porcentaje de identidad que tienen las secuencias de estos genes (de *S. cerevisiae*) con sus homólogos en *D. hansenii* (Tabla 5 anexo) se seleccionó al gen *SLN1* por haber tenido el mayor porcentaje de identidad (43 %), y se buscó en la base de datos del proyecto de "Génolevures". La secuencia homóloga del gen *SLN1* en *D. hansenii* se muestra en la Figura 13.

Aunque ya se tiene la secuencia completa del genoma de *D. hansenii*, no están delimitados los marcos de lectura abierta de cada gen que lo integra, por eso se decidió amplificar la región en donde se localiza el gen *SLN1*, por un PCR. Para esto se diseñaron oligonucleótidos específicos para su secuencia con ayuda del programa de cómputo GCG (Gene Computing Group). Este programa genera un listado de cebadores o primers específicos con el cálculo de sus temperaturas medias, porcentajes de GC y demás características necesarias para el desarrollo óptimo del diseño de los oligonucleótidos. Tomando en cuenta las características mencionadas se seleccionaron los oligonucleótidos que se muestran en la Figura 14 y que fueron sintetizados en la Unidad de Biología Molecular del IFC UNAM.

Con los oligonucleótidos se llevó a cabo la amplificación por PCR que se muestran en la Figura 15. En ella se observan unas bandas (carriles 2, 3 y 4) de 800 pares de bases que representan los productos de la amplificación por PCR obtenidos a partir de los cebadores (Fig. 14) y el DNA genómico de *D. hansenii*. Con estos resultados: 1) que el tamaño de estas bandas correspondiera al

tamaño esperado en relación a las características solicitadas en el programa GCG; 2) la no obtención de productos al hacer el PCR con el DNA genómico de *S. cerevisiae* (carriles 5 y 6) como templado, y 3) la no existencia de contaminación al no obtener producto al hacer el PCR sin templado (carril 7); se comprueba la especificidad de los oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de *SLN1* en esta levadura, necesaria para el desarrollo del RT/PCR.

```

60   TTAATTTTTG ACACATTCTN TCAGGCTGAT GGTTCAACTA CAAGAAAATT CGGTGGTACA
120  GGGTTGGGTT TATCAATCTC AAAGCAATTA ATTCATTTGA TGGGAGGTGA AATCTGGGTT
180  ACATCAGATT ACGGTGAAGG TTCAAATTTT TATTTCACTG TTAGTGTTGC ACCTTCTGCT
240  ATTAGGTATA CTCGCCAAAC TGAACAATTA TTACCATTTG GTGGTCATTA TATTTTGTTC
300  ATCTCTACTG AACATACAAA GGATGAATTA GGTGACATCA AAAATGGTGC ACTTGAATTG
360  GGGTTGAATC CAGTCATTGT GGATAATATT AAAGATGGAA ATTTAACCGA GCCAGTGAGA
420  TATGATATAA TTATGATTGA CTCAATTGAA ACAGCCAAGA ATTTGCGTTT ACTACCAGAA
480  GTGAAGTATA TTCCATTGGT ATTATTGCAT CATTCTATTC CAGAATTGAA CATGAGGGTT
540  TGTATAGATT TAGGTATATC CTCATACGGT AACACTCCTT GTACTATAAG TGATTTGGCC
600  AGTGCATTAA TCCCAGCATT AGAATCAAGA TCGATCGCCC AGAATACTGA TGAATCAGCT
660  TCCTACAATA TACTATTGGC TGAAGATAAT TTGGTTAATC AAAAGTTAGC GGTAAAATA
720  TTGGAGAAAC AAGGACATCA TGTTGAAGTT GTCGAAAATG GTTTAGAAGC TTTTGAAGCA
780  CTCCAGAAGA CAAAATACGA TGTTGTTTTA ATGGATGTAC AAATGCCTGT AATGGGAGGT
840  TTTGAAGCAA CCGAAAAGAT TAGACAATGG GAAAAGAAAT CCAATCCAAT TGATTCCTTG
900  AGTTTCAGAA CTCCTATAAT CGCATTAACG GCACATGCAA TGTTGGGTGA TAGAGAAAAG
960  TCTTTAGCCA AAGGTATGGA TGATTATGTT TCAAAGCCGT TGAAACCAA TTATTGATGC
1020 AACAAATTAGT AAATGCATTC ATATATTRGG

```

Figura 13. Secuencia del gen homólogo *SLN1* en *D. hansenii*.

Forward Primer: 21	
5'	3'
903 AGACTTTTCTCTATCACCCAAC 882	
[DNA]= 50.000 nM [SALT] = 50.000 nM	Annealing store: 13
Primer %GC: 40.9	Primer Tm: 54.3
Reverse Primer: 13	
5'	3'
118 GTTACATCAGATTACGGTGAAG 139	
[DNA]= 50.000 nM [SALT] = 50.000 nM	Annealing store: 15
Primer %GC: 40.9	Primer Tm: 54.0

Figura 14: Características de los oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia del gen homólogo *SLN1* en *D. hansenii*.

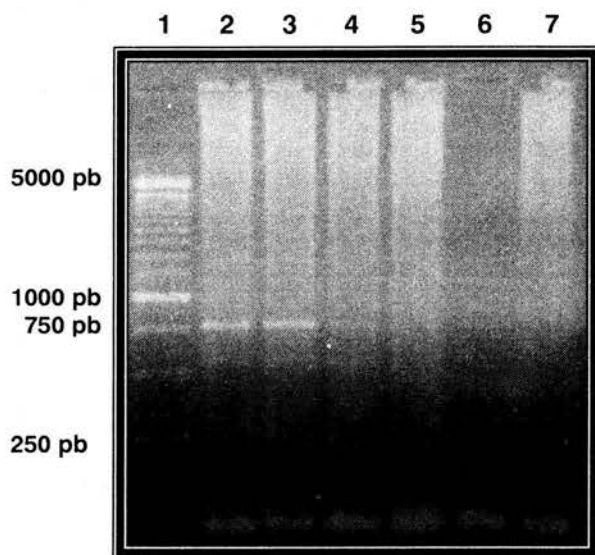


Figura 15. Electroforésis de los productos de la amplificación por PCR de la región en donde se localiza el gen homólogo *SLN1* en *D. hansenii*. Gel de agarosa al 1%. 10 μ l de muestra. Indicador de peso molecular (Carril 1); amplificación a partir del DNA de *D. hansenii* (Carriles 2, 3 y 4); y de *S. cerevisiae* como control de especificidad (Carriles 5 y 6); y sin DNA como blanco (Carril 7).

Se puede ver en la Figura 15 que existen diferencias entre la intensidad de las bandas obtenidas (carriles 2, 3 y 4) que se deben a que el templado (DNA genómico) proviene de diferentes cultivos de *D. hansenii*, y probablemente se tenía mayor cantidad de DNA genómico en las muestras correspondientes a los carriles 2 y 3 que el obtenido en la muestra del carril 4. En la parte baja de la fotografía se observa la presencia de bandas (carriles 2 al 7) que representan los cebadores utilizados en la amplificación.

Con los oligonucleótidos específicos y los RNAs aislados anteriormente (Fig. 8) se llevaron a cabo dos amplificaciones más mediante una reacción tipo RT/PCR (ver metodología), con el objeto de estudiar la expresión del gen en presencia de las tres concentraciones de NaCl consideradas en este trabajo. En el primer RT/PCR, los RNAs utilizados se trataron con la enzima DNAsa (Fig. 16A), para eliminar el DNA genómico presente en la muestra y evitar que la amplificación se diera a partir de este; y en la segunda reacción, los RNAs no se trataron con la enzima (Fig. 16B), como un control. En la Figura 16A se observan unas bandas de 800 pb que representan los productos obtenidos a partir del RT/PCR, y que se relacionan con los productos obtenidos en el PCR (Fig. 15). La intensidad de las bandas aumenta en relación directa con la concentración de NaCl; a menor concentración NaCl (carriles 1 a 6) la intensidad es más discreta que la intensidad de las bandas en las concentraciones mayores (carriles 7 a 12). En las condiciones donde el RT/PCR apenas comenzaba (carriles 1, 4, 7 y 10), tras 20 ciclos, no hay amplificación y ésta sólo puede verse en la concentración de 2.0 M de NaCl; y conforme aumentaron los ciclos, 30 y 40, también se incrementó el amplificado. En la Figura 16B, la diferencia con respecto a la Figura anterior es que al no tratar a los RNAs con la DNAsa, la reacción de PCR se llevó a cabo en todas las condiciones, a partir del DNA genómico de las muestras, por ello se observan bandas que antes no se habían amplificado (carriles 1, 4 y 7). En la parte baja de ambas fotografías, se observa la presencia de bandas (en todos los carriles) que representan los cebadores utilizados durante la amplificación.

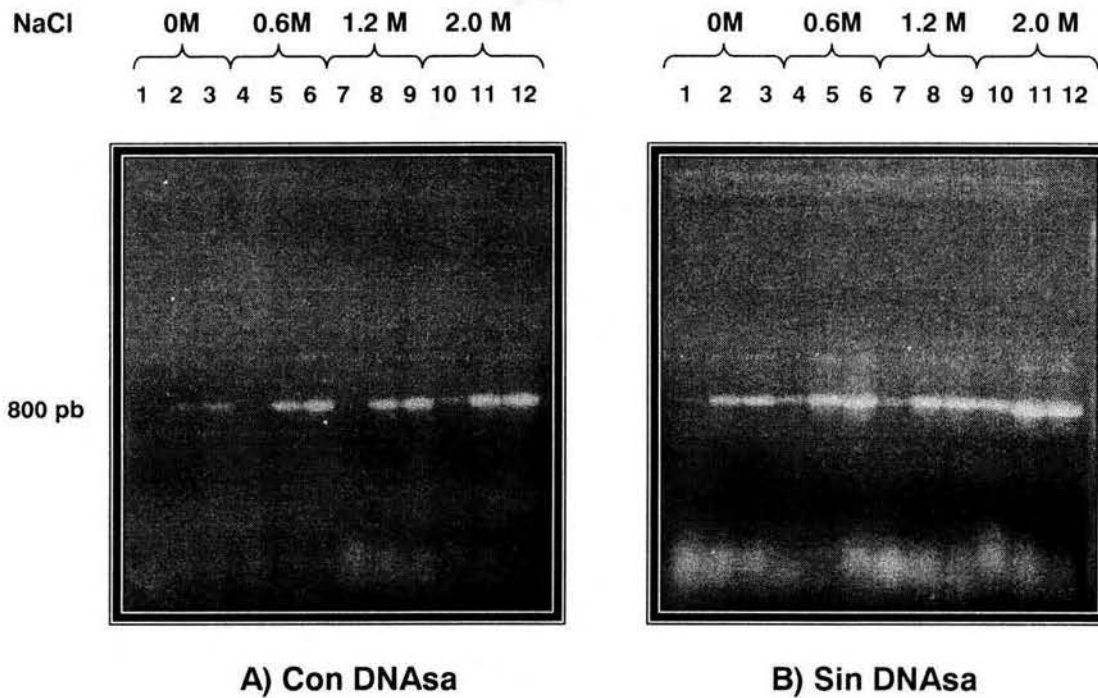


Figura 16. Electroforesis del RT/PCR en *D. hansenii*. Gel de agarosa al 1%. 10 μ l de muestra. células crecidas sin NaCl y 20 (Carril 1), 30 (Carril 2), y 40 ciclos de PCR (Carril 3); con 0.6 M NaCl y 20 (Carril 4), 30 (Carril 5), y 40 ciclos de PCR (Carril 6); con 1.2 M NaCl y 20 (Carril 7), 30 (Carril 8), y 40 ciclos de PCR (Carril 9); y con 2.0 M NaCl y 20 (Carril 10), 30 (Carril 11), y 40 ciclos de PCR (Carril 12). A) RNAs tratados con DNAsa; B) sin DNAsa.

Discusión

El análisis genético es una poderosa herramienta que permite identificar los genes y/o proteínas involucrados en las respuestas de los organismos vivos ante diferentes condiciones ambientales. Algunos cambios en estas condiciones pueden representar un estrés para los organismos y sólo algunos son capaces de tolerarlos. Ciertos organismos, mediante modificaciones en sus respuestas, lograron una estructura y mecanismos génicos que los volvieron tolerantes a los cambios en sus ambientes. Es por eso que los estudios en estos mecanismos son importantes para conocer las bases de la tolerancia a distintos tipos de estrés. Una manera de abordar este conocimiento consiste en estudiar los niveles de expresión génica del organismo en cuestión; sin embargo, los métodos tradicionales analizan un gen o los niveles de expresión de solo algunos genes. Es por eso que se han hecho estudios mediante el sistema de microarreglos de DNA que han revelado cambios en la expresión de un gran número de genes. Existen muchos trabajos enfocados al análisis de la expresión global que utilizan a los microarreglos para observar la respuesta genética de la levadura *S. cerevisiae* a cambios en su ambiente como puede ser en: temperatura (Gasch *et. al.*, 2000; Causton *et. al.*, 2001), oxidación (Gasch *et. al.*, 2000; Causton *et. al.*, 2001), nutrientes (Gasch *et. al.*, 2000; Causton *et. al.*, 2001), pH (Causton *et. al.*, 2001), y osmolaridad (Gasch *et. al.*, 2000; Posas *et. al.*, 2000; Rep *et. al.*, 2000; Causton, *et. al.*, 2001; Yale y Bohnert, 2001).

Siendo la adaptación a la salinidad un fenómeno biológico tan importante, se decidió estudiar la composición génica de un microorganismo que no sólo tolera sino que parece preferir condiciones de alta salinidad para vivir: la levadura marina *D. hansenii*. Este organismo se ha clasificado como osmo o halotolerante, y también como halofílico, debido a que algunas de sus cepas crecen y funcionan mejor en presencia de concentraciones relativamente altas de sal. Creemos que este enfoque puede darnos respuestas interesantes y tal vez diferentes a las

observadas con un microorganismo de un organismo que no tolera concentraciones elevadas de sal.

La hibridación encontrada de 3117 genes de *D. hansenii*, en el primer microarreglo (hibridizado solamente con DNA genómico de *D. hansenii*) integrado por 6017 genes (Fig. 5), valida la hibridación heteróloga en la que se fundamenta este trabajo. *D. hansenii* y *S. cerevisiae* pertenecen a la clase Hemiascomiceta, y en base a las homologías encontradas entre ambas por el grupo de Lépingle, A. (2000), se esperaba encontrar un número menor de genes que hibridaran bajo estas condiciones (al disponer del 20% del genoma de *D. hansenii*, encontraron que 1119 ORF tenían homología con *S. cerevisiae*). Los resultados obtenidos implican una gran homología (51.8%) entre ambos genomas, y garantizan los experimentos de este trabajo.

El segundo microarreglo (Fig. 6) permitió identificar a 251 genes de *D. hansenii* cuya homología es tan grande con los de *S. cerevisiae*, que les permitió competir exitosamente con los de genes de *S. cerevisiae* en el microarreglo de ésta misma especie. Además, las comparaciones hechas por blast entre las secuencias de los 251 genes de *S. cerevisiae* obtenidas en el microarreglo y sus genes homólogos en *D. hansenii* mostraron que para que en un microarreglo heterólogo exista hibridación, el porcentaje mínimo de identidad entre los genes de ambas especies debe de ser de un 28 %.

El número de resultados positivos obtenidos en los microarreglos hibridizados con RNA (Figs. 9, 10 y 11) refleja que entre un 4 y un 15 % del genoma de *D. hansenii* responde a las diferentes concentraciones de sal. Estos porcentajes no están muy alejados de lo reportado por Hohmann (2002), en donde mediante el análisis de la expresión global de genes mostró que ante diversas condiciones de estrés, como nutrientes, estrés oxidativo, choque térmico y choque hiperosmótico, se afecta la expresión del 10% de los genes de la levadura.

Por otro lado, el patrón de expresión génica en estos tres microarreglos (Figs. 9, 10, 11) fue similar (Tabla 4); un mayor número de genes reprimieron su

expresión en comparación con aquellos que la aumentaron. El número de genes aumentó en relación directa con la concentración de NaCl, es decir, a menor concentración (0.6 M) menor fue el número de genes que cambiaron su nivel de expresión y por el contrario, a mayor concentración (2.0 M) mayor fue el número de genes que cambiaron. Aunque no con una coincidencia en todos, este comportamiento es lógico considerando que la concentración más baja (0.6 M) no representa un estrés para la levadura, pues es su condición natural, y al subir la concentración tres veces (2.0 M) se genera un estrés mayor a lo que se podría lograr con 1.2 M. Para poder adaptarse a las condiciones de alta salinidad, *D. hansenii*, utiliza principalmente aquellas funciones necesarias para su adaptación y supervivencia en estas condiciones estresantes; por lo que resulta lógico esperar que aquellas funciones no vitales para el proceso adaptativo sean interrumpidas, lo que se refleja como una disminución en la expresión de los genes involucrados. El hecho de que hubiera un menor porcentaje de genes sobre-expresados que de genes reprimidos concuerda con lo reportado por Hohmann y Mager (2003) para *S. cerevisiae*, en donde en estudios de estrés osmótico, el número de genes cuya expresión disminuye suele ser mayor que el de aquéllos cuya expresión aumenta; y el mismo caso se presenta en el trabajo realizado por Causton y colaboradores (2001), también para *S. cerevisiae*, bajo varias condiciones de estrés causado por temperatura, oxidación, nutrientes, pH y osmolaridad (1M de NaCl).

La selección del microarreglo hibridizado con RNA de *D. hansenii* cultivada sin sal y con 2.0 M de NaCl para analizar con mayor detalle los cambios presentes, se debió a que fue el experimento que generó el mayor número de cambios en los niveles de expresión, tanto en sobre-expresión como en represión, en comparación con los cambios ocurridos en las otras dos concentraciones. Además, se decidió centrar la atención en los genes sobre-expresados con el objeto de lograr un análisis más fino de lo que sucede en el metabolismo de la levadura; pues abarcar ambos procesos al mismo tiempo complica el análisis de este estudio. El análisis de los genes reprimidos se

analizará en trabajos posteriores, que permitirán obtener una visión más completa de la respuesta de la levadura a las condiciones de alta salinidad.

Para comprender el comportamiento de la expresión de los genes en 2.0 M fue necesario el análisis de cada gen por separado, así como su comportamiento inicial en 0.6 y 1.2 M. Este comportamiento distinto en cada uno de los genes que integran el microarreglo (Tabla 5 anexo) debe depender de su papel en el metabolismo de la levadura. En general se puede pensar que los genes que mostraron aumentos transitorios están involucrados en facilitar el paso de una concentración a otra. Los genes cuyos niveles cambiaron a un nuevo nivel y permanecieron alterados probablemente codifican productos que tienen un papel continuo en la célula bajo la nueva concentración. Estos comportamientos diferentes en la expresión de los genes ya han sido observados anteriormente en otros trabajos como en el de Causton y colaboradores (2001).

Para obtener una visión más amplia de las funciones que realiza cada gen sobreexpresado en el microarreglo con 2.0 M de NaCl, se decidió utilizar como herramienta de análisis el programa de la "Enciclopedia de los genes y genomas 2 de Kioto", para encontrar una relación entre los procesos desarrollados por estos genes y la adaptación a la salinidad de esta levadura. Las bases de datos consultadas en este trabajo son del genoma de *S. cerevisiae*, pues no existe todavía algo similar en *D. hansenii*; y todos los análisis han sido fundamentados en las homologías existentes entre ambas levaduras. En los resultados (Tabla 4) obtenidos se observan las vías metabólicas más importantes que tienen lugar en la levadura *S. cerevisiae* y los genes que participan en ellas. Existen genes involucrados en más de una vía metabólica a la vez; como *ADE12*, *GUA1*, *KGD2*, *MAL32*, *PAN6*, *RAM1* y *VMA13*, involucrados en dos procesos a la vez; el gen *RPA190* involucrado en tres procesos a la vez, *IPL1*, *KIN1*, *SAT4* y *YAK1* involucrados en 6 procesos, *CHK1* involucrado en 8 procesos, y por último *MNN1*, involucrado en 11. Todos los procesos en los que participa más de un gen están relacionados directa o indirectamente, por lo que es de esperarse que

varios genes compartan una misma función; este fenómeno es común en la naturaleza.

Los análisis de expresión genética han revelado que el estrés osmótico también suele afectar la expresión de genes implicados en el metabolismo de los lípidos (Hohmann y Mager, 2003). La sobre-expresión de ocho genes involucrados en el metabolismo de los lípidos (Tabla 4) como los glicerolípidos y los esfingolípidos puede deberse a la necesidad de la célula de consumir metabolitos diferentes de la glucosa para generar energía, o como en el caso de los carbohidratos, a la producción de glicerol generado también por la degradación de los glicerolípidos.

Otra posibilidad es que este metabolismo esté relacionado con la síntesis de los componentes de las membranas celulares. En este sentido, Hohmann y Mager (2003) observaron que el estrés osmótico en células de *S. cerevisiae* perturba la membrana plasmática a nivel de su estructura, permeabilidad y propiedades mecánicas. Estos cambios afectan la actividad de varias proteínas transmembranales que dependen de su ambiente lipídico. La sobre-expresión de 4 genes relacionados con la superficie celular y formación de la pared celular, como los N y O-glicanos (Tabla 4) puede deberse a la necesidad de la célula por proteger sus membranas plasmáticas. Es de esperarse que los procesos de manejo de la membrana y pared celular estén alterados por los cambios en la estructura de la célula bajo estas condiciones de estrés.

Se ha reportado también que el estrés osmótico disminuye fuertemente el transporte de aminoácidos (Hohmann y Mager 2003), por lo que puede ser que la sobre-expresión de 5 genes involucrados en el metabolismo de aminoácidos como la alanina, el aspartato, la glicina, la serina, la treonina, la lisina, la fenilalanina, la tirosina y el triptofano (Tabla 4) pueda ser una respuesta a la necesidad de la célula de una mayor disponibilidad de aminoácidos, para obtener energía a partir de compuestos diferentes de los carbohidratos o lípidos.

La sobre-expresión de 14 genes involucrados en el metabolismo de

carbohidratos como la fructosa, manosa, galactosa, almidón y sacarosa (Tabla 4) puede deberse a la necesidad de la célula de mantener sus fuentes o reservas de energía. El metabolismo de la galactosa, el almidón y la sacarosa lleva a las células a la producción de glucosa, la fuente de carbono preferida por la levadura. Una mayor cantidad de glucosa en las células puede obligar al metabolismo a incrementar la eficacia de la glucólisis, de la cual la fructosa y la manosa también son sustratos. La sobre-expresión de estos genes podría implicar alguna función en la producción de glicerol que se forma a partir de la dihidroxiacetona fosfato, un intermediario de la glucólisis.

En varios casos se ha demostrado que la exposición a un solo tipo de estrés permite también la tolerancia a otros tipos diferentes de estrés; hay genes de respuesta general al estrés, sin importar su tipo, y este fenómeno de respuesta cruzada sugiere que diferentes condiciones de estrés requieren respuestas celulares comunes entre ellas. El inicio de la respuesta al estrés es transitoria: inmediatamente después del cambio a un nuevo ambiente la célula responde con cambios en la expresión de los genes de respuesta a estrés. Estos genes han sido estudiados mediante el cambio rápido de las células de una condición a otra (Hohmann, 2003).

Es posible que los genes sobre-expresados: *ARE1*, *GLC3*, *PSD1*, *YAK1*, *CDC53*, *CDC26*, *CDC47* y *SOL4* (Tabla 4) sean genes de respuesta general al estrés, ya que todos han sido reportados anteriormente como sobre-expresados en experimentos de choque hiperosmótico. *ARE1*, reportado por Yale (2001), es un gen que en un microarreglo se encontró sobreexpresado a 1 M de NaCl durante 10, 30 y 90 minutos. Los genes *GLC3*, *PSD1*, *YAK1*, *CDC53*, *CDC26*, *CDC47* y *SOL4*, reportados por Rep y colaboradores (2000), son genes cuya sobre-expresión después de de un choque osmótico a 0.5 y 0.7 M de NaCl fue dependiente de la vía HOG (del glicerol a alta osmolaridad).

Por otro lado, la localización de los genes dentro de las vías metabólicas en las que participan permitió distinguir una vía interesante para los fines de este

trabajo perteneciente a la cascada de señalización de las MAP cinasas (Fig. 12). Estas vías son una unidad de señalización altamente conservada en todos los eucariontes y participan en procesos importantes para la respuesta a las señales ambientales, hormonas, factores de crecimiento y citocinas. Las MAP cinasas controlan el crecimiento celular, morfogénesis, proliferación, y respuestas a estrés. *S. cerevisiae* tiene cinco MAP cinasas: 1) vía de apareamiento por respuesta a feromona (MAP cinasa Fus3p), 2) vía de desarrollo pseudohifal (Kss1p), 3) vía HOG (Hog1p), 4) vía de la proteína cinasa C (PKC) de integridad celular (Sit2/Mpk1p), y 5) la vía para establecer la pared de la espora (Smk1p) (Hohmann, 2003). Se ha visto que los cambios en la osmolaridad del medio afectan las diferentes vías de señalización en levaduras, como las vías de respuesta general a estrés y la vía HOG (Fig. 2) que se utilizan para estimular las respuestas transcripcionales que contrarresten el estrés causado por estos cambios (O'Rourke, 2004).

Los genes sobre-expresados *SLN1*, *SHO1* y *SSK22* (Figs. 12 y 13) forman parte de la vía HOG. Esta vía utiliza dos proteínas transmembranales (Sho1p y Sln1p) para responder a la alta osmolaridad externa y las señales de cada una son traducidas por componentes únicos y convergen para activar a la MAPKKK Pbs2. La rama Sho1 requiere a Cdc42, Ste20 y Ste50 para activar a la MAPKKK Ste11 (O'Rourke, 2004). La rama Sln1 necesita Ypd1 y Ssk1 para activar a dos MAPKKK, Ssk2 y Ssk22 (Posas *et. al.*, 1996; Posas y Saito, 1998). Cualquiera de estas tres MAPKKK osmoresponsivas (Ste11, Ssk2 y Ssk22) son capaces de activar a Pbs2, la cual fosforila a la MAPK Hog1 (O'Rourke, 2004). El osmosensor Sln1 está activado constitutivamente en medios con presión osmótica constante, en donde inhibe la actividad de Ssk1 (Posas *et. al.*, 1996). Bajo condiciones de alta osmolaridad externa, Sln1 es inhibido, resultando en la activación de Ssk1, y por consiguiente en la activación de Ssk2 y Ssk22, las cuales activan a Pbs2 (Posas y Saito, 1998). Pbs2 fosforila a Hog1, que es translocado hacia el núcleo induciendo transcripcionalmente a una gran cantidad de genes, algunos de los cuales son responsables de la producción de glicerol,

un soluto compatible en levaduras (Hohmann, 2003; Hohmann y Mager 2003) (ver introducción). Se ha visto que, durante el crecimiento exponencial, a altas concentraciones de NaCl *D. hansenii* mantiene su balance osmótico mediante la producción y acumulación de glicerol (Lucas y colaboradores, 1990). Gustafsson y Norkrans (1976) midieron la concentración de glicerol producida por *D. hansenii* durante su cultivo a 4 mM, 0.68 M y 2.7 M de NaCl, y encontraron que la cantidad total de glicerol fue directamente proporcional a la salinidad del medio de cultivo, con una concentración máxima al inicio de la fase estacionaria. Las concentraciones de glicerol intracelular también aumentaron conforme a la salinidad del medio, 0.2 M, 0.8 M y 2.6 M respectivamente. Adler y Gustafsson (1980) midieron los cambios en la producción de polioles por *D. hansenii* en un medio de cultivo con 4 mM y 2.7 M de NaCl, y encontraron que los niveles intracelulares de los polioles aumentaban marcadamente con la alta salinidad y que el soluto dominante fue el glicerol. En el alga marina *Dunaliella parva* Ben y Avron (1973) encontraron que el glicerol también se acumula hasta una concentración de 2 M cuando el alga se adapta a una concentración extracelular de 1.5 M de NaCl.

Es por eso que habiendo localizado a tres de los muchos genes que participan en esta vía HOG tan importante para la osmoadaptación se decidió trabajar con el gen *SLN1*; aunado a que su secuencia (*S. cerevisiae*) tuvo mayor porcentaje de identidad con la secuencia del gen homólogo en *D. hansenii*, en comparación con los porcentajes de Ssk22 y Sho1 (Tabla 5 anexo). El diseño de oligonucleótidos se hizo con el objetivo de comprobar mediante la técnica de RT/PCR la sobre-expresión de *SLN1* que se observó en el sistema de microarreglos. La amplificación por PCR (Fig. 15) brindó la seguridad de contar con oligonucleótidos específicos para *D. hansenii*, la cual se comprobó al no obtener amplificación a partir del DNA genómico de *S. cerevisiae*. Esta especificidad evitó problemas durante la reacción de RT/PCR. Con esta técnica la enzima transcriptasa inversa sintetizó cDNA a partir del RNA mensajero aislado de las cuatro condiciones antes mencionadas. Se esperaba obtener una

banda cuya intensidad fuera aumentando en relación directa con la concentración de sal, y tal fue el caso. Las figuras 16A y B, muestran que el nivel de expresión del gen *SLN1* aumentó conforme la concentración de NaCl. La figura 16B es sólo un control que muestra que, a partir del DNA genómico que no puede eliminarse durante el proceso de aislamiento de los RNAs, puede amplificarse este gen.

Finalmente es necesario señalar que aunque la técnica nos ofrece resultados interesantes, el grado de incertidumbre en cuanto a muchos de los genes cuya expresión se modificó, es grande. Una razón para explicar esto consiste en que aunque hay una homología grande entre los genomas de *S. cerevisiae* y de *D. hansenii*, esta es sólo del 50%, lo cual deja fuera muchos genes que pudieran ser interesantes en este estudio. Otro obstáculo se refiere al desconocimiento de las funciones de muchos de los genes cuya expresión aumentó, y que aún existiendo en *S. cerevisiae*, no se conoce su función. Es probable, sin embargo, que a medida que avancen las investigaciones sobre ambos genomas, avance también el conocimiento sobre las funciones de cada vez más genes de *S. cerevisiae*. Pero en particular de aquellos genes que coinciden en *D. hansenii* y más aún de los que se sobreexpresan.

Conclusiones

- El sistema de microarreglo heterólogo puede ser confiable para estudiar la expresión genética en *D. hansenii*.
- Con este sistema se identificaron 3117 genes homólogos, de un total de 6017, entre *D. hansenii* y *S. cerevisiae*; implicando una homología del 51.8 % entre ambos genomas.
- Entre un 4 y un 15 % del genoma de *D. hansenii* responde a las diferentes concentraciones de sal.
- Al crecer las células en sal, el patrón de expresión génica mostró más genes reprimidos que sobre-expresados.
- La concentración de 2.0 M de NaCl provocó el mayor cambio en la expresión genética en *D. hansenii*.
- Sin embargo existen diferencias en el patrón de expresión individual de los genes desde 0.6, hasta 1.2 y 2.0 M de NaCl.
- La mayoría de los genes sobre-expresados están involucrados en más de una vía metabólica.
- Fue posible identificar a genes que codifican para enzimas del metabolismo de carbohidratos y lípidos, en el transporte de aminoácidos, y de respuesta general a estrés.
- Se sobre-expresaron tres genes (*SLN1*, *SHO1* y *SSK22*) pertenecientes a una de las cascadas de señalización de las MAPK cinasas, la vía HOG1. Es posible que esta respuesta cubra, entre otros objetivos, la producción de glicerol.
- De los genes identificados, la secuencia del gen *SLN1* de *S. cerevisiae* tuvo el mayor porcentaje de identidad con la secuencia del gen homólogo en *D. hansenii* en comparación con los porcentajes de Ssk22 y Sho1.

- Se comprobó por RT/PCR la sobre-expresión del gen *SLN1* en *D. hansenii* observada por el microarreglo heterólogo, su nivel de expresión aumentó conforme la concentración de NaCl.
 - El enfoque utilizado ofrece resultados interesantes pero la incertidumbre es grande, pues la homología entre los genomas de *S. cerevisiae* y de *D. hansenii* es sólo del 50% y se desconocen las funciones de muchos de los genes cuya expresión aumentó aún existiendo en *S. cerevisiae*.
-

Bibliografía

- Adler, L., Gustafsson, L. 1980. Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. Archives of Microbiology 124: 123-130.
- Alba, L., Segal, C., Rodarte, B., Valdés, V., DeLuna, A., Cárdenas, R. 2004. NADP-glutamate dehydrogenase activity is increased under hyperosmotic conditions in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. Current Microbiology 46: 68-72.
- Almagro, A., Prista, C., Benito, B., Loureiro, M., Ramos, J. 2001. Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. J. Bacteriol. 183:3251-3252.
- Almagro, A., Prista, C., Castro, S., Quintas, C., Madeira, A., Ramos, J., Loureiro, M. 2000. Effects of salt on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. Int. J. Food Microbiol. 56:191-197.
- Bansal, P., Sharma, P., Mondal, A. 2001. A PBS2 homologue from *Debaryomyces hansenii* shows a differential effect on calcofluor and polymyxin B sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 18:1207-1216.
- Bansal, P., Sharma, P., Mondal, A. 2001. A minisatellite sequence in the upstream region of the *DURA3* gene from the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. Yeast 18:1301-1307.
- Bansal, P., Mondal, A. 2000. Isolation and sequence of the *HOG1* homologue from *Debaryomyces hansenii* by complementation of the *hog1Δ* strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 16:81-88.
- Ben, A., Avron, M. 1973. The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella parva*. Plant Physiology 51: 875-878.
- Blomberg, C., Adler, L. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. Adv Microbial Physiol 33: 145-212.
- Bolumar, T., Sanz, Y., Aristoy, M., Toldrá, F. 2003. Purification and characterization of a prolyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. Applied Environmental Microbiology 69:227-232.
- Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansorge, W., Ball, C., Causton, H., Gaasterland, T., Glenisson, P., Holstege, F., Kim, I., Markowitz, V., Matese, J., Parkinson, H., Robinson, A., Sarkans, U., Schulze, S., Stewart, J.,

Taylor, R., Vilo, J., Vingron, M. 2001. Minimum information about a microarray experiment (MIAME) toward standards for microarray data. Nature Publishing Group. Nature Genetics 29:365-371.

- Causton, H., Ren, B., Seok, S., Harbison, C., Kanin, E., Jennings, E., Ihn, T., True, H., Lander, E., Young, R. 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. Mol. Biol. Cell 12:323-337.
- Corredor, M., Davila, A., Casarégola, S., Gaillardin, C. 2003. Chromosomal polymorphism in the yeast species *Debaryomyces hansenii*. Antonie van Leeuwenhoek 84:81-88.
- Corredor, M., Davila, A., Gaillardin, C., Casarégola, S. 2000. DNA probes specific for the yeast *Debaryomyces hansenii*: useful tools for rapid identification. FEMS Microbiology Letters 193: 171-177.
- Gírio, F. M., Amaro, C., Azinheira, H., Pelica, F., Collaço, A. 2000. Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaryomyces hansenii*. Bioresource Technology 71: 245-251.
- González, J. C., Cárdenas, C. A., Peña, A. 2004. Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. Yeast 21:403-412.
- González, J. C., Peña, A. 2002. Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). Rev. Latinamer. Microbiol. Review Article 44:137-156.
- Gustafsson, L., Norkrans, B. 1976. On the mechanism of salt tolerance. Production of glycerol and heat during growth of *Debaryomyces hansenii*. Archives of Microbiology 110: 177-183.
- Hernández, N., Ochoa, J. 1999. Cooper-zinc superoxide dismutase from the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. Yeast 15:657-668.
- Hoffman, X., Winston, X. 1987 "A ten-minute DNA preparation from yeast" Gene 57: 267-272.
- Hohmann, S., Mager, W. 2003. Yeast stress responses. Topics in Current Genetics. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, p. 389.
- Kinne, O. 1971. Marine Ecology. A comprehensive, integrated treatise on life in oceans and coastal waters. Volume I Environmental factors Part 2. p.p.1244.
- Larsson, K., Eriksson, P., Ansell, R., Adler, L. 1993. A gene encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol 10: 1101-1111.

-
- Lépingle, A., Casaregola, S., Neuvéglise, C., Bon, E., Nguyen, H., Artiguenave, F., Wincker, P., Gaillardin, C. 2000. Genomic exploration of the Hemiascomycetous yeasts: 14. *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*. FEBS Lett. 487:82-86.
 - Libes, S. 1992. An Introduction to Marine Biogeochemistry. John Wiley & Sons, Inc. Canada. Pp.734.
 - Lucas, C., Da Costa, M., Uden, V. 1990. Osmoregulatory active sodium-glycerol co-transport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. Yeast 6: 187-191.
 - McNeill, J. 1979. Sea Microbes. Ed. Oxford. Pp.
 - Norkrans, B. 1966. Studies on marine occurring yeast: growth related to pH, NaCl concentration and temperature. Arch. Mikrobiol. 54:374-392.
 - O'Rourke, S., Herskowitz, I. 2004. Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. Molecular Biology of the Cell 15: 532-542.
 - Petrovic, U. Gunde, N., Plemenitas, A. 2002. Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea wernickei*. Mol. Microbiol. 45:665-672.
 - Posas, F., Chambers, J., Heyman, J., Hoeffler, J., De Nadal, E., Ariño, J. 2000. The transcriptional response of yeast to saline stress. J. Biol. Chem. 275:17249-17255.
 - Posas, F., Saito, H. 1998. Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. EMBO J. 17: 1385-1394.
 - Posas, F., Wurgler, S. M., Maeda, T., Witten, E. A., Thai, T. C., Saito, H. 1996. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. Cell 86: 865-875.
 - Prista, C., Almagro, A., Loureiro, M., Ramos, J. 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. Appl. Environ. Microbiol. 63:4005-4009.
 - Ramírez, J., Chávez, L., Santillán, J., Guzmán, S. 2003. Microarreglos de DNA. Mensaje Bioquímico UNAM XXVII: 97-119.
 - Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J., Hohmann, S. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. J. Biol. Chem. 275:8290-8300.
 - Schena, M. 2003. Microarray Analysis. A John Wiley & Sons, Inc., Publications. USA. Pp. 630.
 - Sherman, D. Durrens, P., Beyne, E., Nikolski, M., Souciet, J. 2004. Génolevures: comparative genomics and molecular evolution of hemiascomycetous yeasts. Database issue. Nucleic Acids
-

Research 32: D315-D318. <http://cbl.labri.fr/Genolevures/genolevures.php>

- Souciet, J. Aigle, M. Artiguenave, F., Blandin, B., Bolotin, M., Bon, E., Brottier, P., Casaregola, S., De Montigny, J., Dujon, B., Durrens, P., Gaillardin, C., Lépingle, A., Llorente, B., Malpertuy, A., Neuvéglise, C., Ozier, O., Potier, S., Saurin, W., Tekaia, F., Toffano, C., Wésolowski, M., Wincker, P., Weissenbach, J. 2000. Genomic exploration of the Hemiascomycetous yeasts: 1. A set of yeast species for molecular evolution studies. *FEBS Lett.* 487:3-12.
- Thomé, P. 2004. Isolation of a gene from *Debaryomyces hansenii* encoding a glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). *Yeast* 21:119-126.
- Thomé, P., Peña, A. Ramírez, J. 1998. Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentrations of KCl and NaCl. *Yeast* 14:1355-1371.
- Van N., Fell, J. 1968. Marine Yeasts. *Advances in microbiology of the sea. Vol. 1.* Academic Press London and New York. p. 167-201.
- Veiga, A., Arrabaça, J., Loureiro, M. 2003. Stress situations induce cyanide-resistant respiration in spoilage yeast. *J. Appl. Microbiol.* 95:364-371.
- Yadav, J., Loper, J. 1999. Multiple P450alk (cytochrome P450 alkane hydroxylase) genes from the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Gene* 226:139-146
- Yale, J., Bohnert, H. 2001. Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *The J. Biol. Chem.* 276:15996-16007.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., Somero, G. N. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217: 1214-1222.

Anexo

Medios de cultivo

⇒ Medio YPGAL + 1 M NaCl

Extracto de levadura	1 %	10 g/lt
Extracto de peptona	1 %	10 g/lt
Galactosa	2 %	20 g/lt
Agar	2 %	20 g/lt

Na = 23 g + Cl = 35.44 g = 58.44 g = 1 M NaCl = 58.44 g en 1 lt

⇒ Medio YPD

Extracto de levadura	1 %	10 g/lt
Extracto de peptona	1 %	10 g/lt
Glucosa	2 %	20 g/lt
Agar	2 %	20 g/lt

⇒ Medio YPD + 0.6 M NaCl

Extracto de levadura	1 %	10 g/lt
Extracto de peptona	1 %	10 g/lt
Glucosa	2 %	20 g/lt

NaCl = 58.44 g = 1 M NaCl en 1 lt ; 0.6 M NaCl = 35.06 g en 1 lt

⇒ Medio YPD + 1.2 M NaCl

Extracto de levadura	1 %	10 g/lt
Extracto de peptona	1 %	10 g/lt
Glucosa	2 %	20 g/lt

NaCl = 58.44 g = 1 M NaCl en 1 lt; 1.2 M NaCl = 70.12 g en 1 lt

⇒ *Medio YPD + 2.0 M NaCl*

Extracto de levadura	1 %	10 g/lit
Extracto de peptona	1 %	10 g/lit
Glucosa	2 %	20 g/lit

NaCl = 58.44 g = 1 M NaCl en 1 lit; 2.0 M NaCl = 116.86 g en 1 lit

Geles para DNA

⇒ *Gel*

Buffer TBE IX	300 ml
Agarosa	3 g
Bromuro de Etidio (10 mg/ml)	5 µl

⇒ *Buffer de corrida*

Buffer TBE IX 100 ml (Buffer TBE 10X) + 900 ml agua

⇒ *Aplicación de las muestras*

Agua	8 µl
Loading Buffer	2 µl
Muestra	2 µl
Volumen final	12 µl

El gel se deja correr durante 45 minutos a 100 V.

Geles para RNA

⇒ *Gel*

Agua + dietil pirocarbonato (DEPC)	25.2 ml
Agarosa	0.3 g
MAE 10X	3 ml

Formaldehído	1.8 ml
--------------	--------

Volumen final	30 ml
---------------	-------

La agarosa se disuelve en el agua + DEPC y se funde junto con el MAE 10X; una vez tibio se agrega el formaldehído.

⇒ *Buffer de corrida*

MAE 10X	28 ml
---------	-------

Formaldehído	8.4 ml
--------------	--------

Aforar con agua + DEPC	243.6 ml
------------------------	----------

Volumen final	280 ml
---------------	--------

⇒ *Solución tampón*

Formamida desionizada	2.2 ml
-----------------------	--------

Formaldehído	0.8 ml
--------------	--------

MAE 10X	0.5 ml
---------	--------

Glicerol 80 %	0.4 ml
---------------	--------

Azul de bromofenol 2 %	100 μ l
------------------------	-------------

Volumen final	4 ml
---------------	------

⇒ *Aplicación de las muestras*

Muestra	3 μ l
---------	-----------

Solución tampón	12 μ l
-----------------	------------

Bromuro de Etidio	0.6 μ l
-------------------	-------------

Volumen a cargar	12 μ l
------------------	------------

La muestra se calienta durante 10 minutos a 65° C y se carga. El gel se deja correr durante 45 minutos a 100 V.

Técnicas utilizadas

⇒ *Aislamiento de DNA*

Materiales

Agua estéril	2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 8.0 y 1 mM Na ₂ EDTA
Etanol frío 100 %	TE pH 8.0
Fenol frío	Solución RNAasa a 10 mg/ml
Cloroformo frío	Acetato de amonio 4 M
Alcohol Isoamílico	Perlas de vidrio tratadas con HCl

1. Tomar un paquete celular numeroso, directamente de la placa y resuspender en 50 μ l de agua estéril.
2. Añadir 0.2 ml de 2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 8.0 y 1 mM Na₂ EDTA.
3. Añadir 0.2 ml de la mezcla Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1). Preparado en fresco y lo necesario:

Cloroformo	240 μ l
Fenol	250 μ l
Alcohol Isoamílico	10 μ l
Volumen final	500 μ l

4. Adicionar 0.3 g de perlas de vidrio y mezclar en vortex durante 4 minutos.
5. Añadir 0.2 ml de TE y centrifugar a velocidad máxima durante 5 minutos.
6. Transferir la capa acuosa a un tubo nuevo.
7. Añadir 1 ml de etanol al 100 % y mezclar por inversión.
8. Centrifugar a velocidad máxima durante 2 minutos.
9. Desechar el sobrenadante y resuspender en 0.4 ml de TE y 10 μ l de la solución de RNAasa.
10. Incubar durante 5 minutos a 37° C.
11. Añadir 10 μ l de acetato de amonio 4 M y 1 ml de etanol al 100 %.
12. Mezclar por inversión y centrifugar a velocidad máxima durante 2 minutos.
13. Descartar el sobrenadante, secar el pellet y resuspender en 50 μ l de TE.
14. Mantener en refrigeración hasta su uso.

⇒ *Aislamiento de RNA total*

Materiales

Agua + DEPC (fría y estéril)	Cloroformo
Buffer de lisis: acetato de sodio 0.1 M pH 5.0 y MgCl ₂ 5 mM	Alcohol Isoamílico
SDS 20 %	Hielo seco
DEPC	MgCl ₂ 100 mM
Fenol exclusivo para RNA	Acetato de sodio 3 M pH 5.0
	Etanol exclusivo para RNA al 100 % y 80 %
	Perlas de vidrio tratadas con HCl

Es importante que todos los reactivos estén preparados con agua + DEPC y que todo el material esté esterilizado para trabajar sin RNAasas.

1. Cuando los cultivos alcancen la densidad óptica deseada, centrifugar durante 8 minutos a 3000 r.p.m.
2. Desechar el sobrenadante y resuspender al volumen inicial en agua + DEPC fría.
3. Centrifugar durante 8 minutos a 3000 r.p.m. y desechar sobrenadante.
4. Resuspender en 15 ml de agua + DEPC fría y centrifugar 5 minutos más.
5. Desechar sobrenadante y resuspender en 1 ml de agua + DEPC fría.
6. Transferir a un tubo eppendorf de 1.5 ml y centrifugar durante 2 minutos a velocidad máxima.
7. Desechar el sobrenadante con un tip.
8. Resuspender las células en 470 µl de buffer de lisis y mezclar.

Agua + DEPC	70 µl
Acetato de sodio	330 µl
MgCl ₂	500 µl
Volumen final	10000 µl

9. Agregar rápidamente 25 µl de SDS al 20 % y 5 µl de DEPC. Mezclar.
10. Agregar perlas de vidrio y dar vortex durante un minuto.
11. Agregar 500 µl de la mezcla Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:24:1) y dar vortex durante un minuto.

Fenol	7500 μ l
Cloroformo	7200 μ l
Alcohol isoamílico	300 μ l
Volumen final	15000 μ l

- Meter los tubos destapados a un baño María de 65° C durante 2 minutos.
- Tapar los tubos y dejarlos en el baño durante 3 minutos más.
- Congelar los tubos en un baño de hielo seco más etanol durante 2 minutos o hasta que se congelen.
- Centrifugar durante 8 minutos a velocidad máxima.
- Recuperar la fase acuosa (600 μ l) y transferirla a un tubo nuevo.
- Repetir los pasos del 11 al 15 dos veces. En total 3 extracciones.
- Recuperar la fase acuosa y transferirla a un tubo nuevo en el que se pusieron 5 μ l de MgCl₂ 100 mM.
- Extraer con 500 μ l de la mezcla Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:1) y dar vortex durante 1 minuto.

Cloroformo	4800 μ l
Alcohol Isoamílico	200 μ l
Volumen final	5000 μ l

- Centrifugar durante 5 minutos a velocidad máxima y recuperar la fase superior en un nuevo tubo.
- Agregar 40 ml de acetato de sodio 3 M y mezclar.
- Agregar 1 ml de etanol al 100 %.
- Poner en un baño de hielo seco más etanol hasta que se congelen (15 minutos). En este paso, las muestras pueden quedarse a -80° C durante toda la noche y continuar la técnica al día siguiente.
- Centrifugar durante 15 minutos a velocidad máxima y decantar el sobrenadante.
- Lavar el pellet (sin resuspenderlo) en 500 μ l de etanol al 80 % (preparado con agua + DEPC).
- Centrifugar durante 5 minutos a velocidad máxima y decantar el sobrenadante con el tip

cuidadosamente.

27. Secar el pellet al aire (20 minutos) hasta que este desaparezca o se vuelva transparente.

28. Resuspender en 50 μ l de agua + DEPC.

29. Almacenar a -80° C.

⇒ *Marcado de DNA*

1. (A) 27 μ l de DNA se desnaturalizan durante 5 minutos a 90° C.

2. (B) Hacer la siguiente mezcla:

2 μ l de cada uno de los deoxyoligonucleotidos A, G y C.

15 μ l del Random primer buffer

1 μ l de dUTP Cy3 ó dUTP Cy5 según sea el caso.

1 μ l de la enzima Klenow.

3. Agregar (A) en (B) haciendo un volumen final de 50 μ l e incubar durante 1.5 horas a 25° C.

4. Cuantificar la incorporación de la marca.

⇒ *Marcado de RNA total*

Mezcla de Reacción

Muestra 1	x μ l (el volumen dependerá de la concentración del RNA)
Random nonamers	1 μ l
Anchored Oligo (dt)	1 μ l
Agua	x μ l
Volumen final	11 μ l

Repetir el procedimiento con la muestra 2.

1. Mezclar varias veces con el tip de la micropipeta.

2. Incubar la reacción a 70° C durante 5 minutos.

3. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

4. Centrifugar la reacción a velocidad máxima durante 30 segundos.

5. Adicionar a cada tubo:

5xCy Script Buffer	4 μ l	5xCy Script Buffer	4 μ l
0.1 M DTT	2 μ l	0.1 M DTT	2 μ l
dCTP nucleotide mix	1 μ l	dCTP nucleotide mix	1 μ l
dCTP Cy3	1 μ l	dCTP Cy5	1 μ l
CyScript reverse transcriptase	1 μ l	CyScript reverse transcriptase	1 μ l
Volumen final	20 μ l	Volumen final	20 μ l

6. Mezclar varias veces con el tip de la micropipeta.
7. Incubar la reacción a 42° C durante 90 minutos.
8. Colectar la reacción en el fondo del tubo por centrifugación.
9. Cuantificar la incorporación de la marca.

⇒ *Purificación del DNA marcado*

1. Añadir 650 μ l de buffer PB a una celdilla y leer en el espectrofotómetro como blanco.
2. Añadir los 50 μ l de la muestra para tener un volumen de 700 μ l y mezclar con el tip. Leer en el espectro.
3. Colocar la columna QIAquick en el tubo de colecta (1.5 ml).
4. Aplicar la muestra en la columna y centrifugar durante 60 segundos a velocidad máxima.
5. Decantar la solución excluida y leerla en el espectrofotómetro.
6. Colocar la columna en el mismo tubo.
7. Lavar añadiendo 250 μ l de buffer PE a la columna QIAquick y centrifugar durante 60 segundos a velocidad máxima.
8. Decantar la solución excluida y repetir dos veces más.
9. Centrifugar la columna por última vez durante un minuto a velocidad máxima.
10. Colocar la columna en un tubo limpio.
11. Fluir el DNA con 50 μ l de agua. Dejar un minuto y centrifugar durante un minuto a velocidad máxima. Repetir una vez.
12. Secar la muestra en el "speed-back" (30 minutos).
13. Eluir el DNA con 50 μ l de agua destilada estéril.

⇒ *Lavado del microarreglo*

1. El microarreglo se coloca en una charola que contiene 40 ml SSC 1X, SDS 0.05 %.
2. Esperar a que se desprenda el cubreobjetos y retirarlo.
3. Lavar durante 2 minutos sin dejar de agitar.
4. Cambiar el microarreglo lo más rápido posible a un tubo Falcon con 40 ml SSC 0.06X y lavar durante 2 minutos.
5. Cambiar el microarreglo lo más rápido posible a un tubo Falcon con 40 ml SSC 0.06X y lavar durante 2 minutos.
6. Centrifugar durante 8 minutos para el secado de la laminilla.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Tabla 5: Cambios de expresión de los genes de *D. hansenii* sobreexpresados en 2.0 M de NaCl.

	ORF NAME	GENE NAME	BIOLOGICAL PROCESS	MOLECULAR FUNCTION	0.6 M NaCl	1.2 M NaCl	2.0 M NaCl	% ID
1	YOR341W	RPA190	Transcription from Pol I promoter	DNA-directed RNA polymerase I	1.2471	1.2629	1.7833	81
2	YBL039C	URA7	Phospholipid biosynthesis	CTP synthase	1.1236	1.2222	2.5178	79
3	YHR005C	GPA1	Signal transduction during conjugation and cellular fusion	Heterotrimeric GTPase	-1.124	1.1466	2.2717	73
4	YBR299W	MAL32	Maltose catabolism	Alpha-glucosidase	2.2278	1.9172	2.3092	72
5	YBR202W	CDC47	DNA replication initiation	Chromatin binding	2.2322	2.6029	2.6234	70
6	YDR213W	UPC2	Sterol biosynthesis	RNA polymerase II	1.0547	2.3955	2.9088	66
7	YNL220W	ADE12	Adenosine biosynthesis	Adenylosuccinate synthase	1.5755	1.5028	2.0106	66
8	YNR036C		Protein biosynthesis	Structural constituent of ribosome	1.361	1.0157	1.9619	65
9	YGR280C	PXR1	35S primary transcript processing	RNA binding	-1.114	1.2251	2.2423	63
10	YBL064C	PRX1	Regulation of redox homeostasis	Thioredoxin peroxidase	-1.058	1.1414	1.8557	62
11	YNL330C	RPD3	Regulation of transcription	Histone deacetylase	1.0915	-1.006	2.1126	62
12	YER003C	PMI40	Protein amino acid glycosylation	Mannose-6-phosphate isomerase	1.3806	1.3525	3.8063	60
13	YFR029W	PTR3	Chemosensory perception	Amino acid binding	1.4664	1.1335	1.9848	59
14	YMR100	MUB1	Regulation of budding	Unknown	1.2632	1.2673	1.5632	57
15	YBR041W	FAT1	Very long chain fatty acid metabolism	Long chain fatty acid CoA ligase	1.40304	1.40909	2.3661	56
16	YKR076W	ECM4	Cell wall organization	Unknown	1.4561	1.4227	1.7449	55
17	YEL013W	VAC8	Protein-vacuolar targeting	Protein binding	1.2336	1.6402	1.7077	55
18	YBR016W		Unknown	Hydrofilinas	1.1793	1.4012	2.3889	54
19	YIL170W	HXT12	Sugar transport proteins	Unknown	1.402	1.377	1.8009	54

	ORF NAME	GENE NAME	BIOLOGICAL PROCESS	MOLECULAR FUNCTION	0.6 M NaCl	1.2 M NaCl	2.0 M NaCl	% ID
20	YMR306W	FKS3	Unknown	1,3-beta-glucan synthase	1.0474	1.048	1.4629	54
21	YAR003W	SWD1	Chromatin silencing at telomere	Transcriptional activator	1.5366	1.5496	1.6048	52
22	YDR051C		Unknown	Unknown	1.2672	1.7786	1.949	52
23	YFL002C	SPB4	35S primary transcript processing	ATP dependent RNA helicase	1.11856	1.0755	1.4748	52
24	YJR036C	HUL4	Polyubiquitination	Ubiquinol-cytochrome c reductase	1.1451	1.3619	1.9684	51
25	YOR361C	PRT1	Translational initiation	Translation initiation factor	1.2722	1.1158	1.6003	51
26	YBR087W	RFC5	Mismatch repair	Adenosinetriphosphatae	-1.219	-1.0814	1.6454	50
27	YDR516C	EMI2	Aldohexose specific glucokinase	Unknown	-1.091	-1.1296	2.143	50
28	YPR192W	AQY1	Water transport	Plasma membrane water channel	1.1225	1.054	2.2173	50
29	YDL085W	NDE2	Etanol fermentation	NADH dehydrogenase	3.9351	6.4095	5.1702	48
30	YHR048W		Multidrug resistance protein	Drug transporter activity	2.2434	1.7487	1.6808	48
31	YIL147C	SLN1	Protein amino acid phosphorylation	Osmosensor	1.8712	1.6992	2.0228	43
32	YCR045C		Serin proteases	Unknown	1.0091	1.7208	2.6386	42
33	YDL114W		Nodulation protein	Unknown	1.4616	1.5694	1.5974	41
34	YDR032C	PST2	Unknown	Unknown	1.117	1.391	2.4992	39
35	YDL109C		Lipasa	Lipid metabolism	1.4424	2.0454	3.8051	39
36	YPL209C	IPL1	Chromosome segregation	Ser/thre protein kinase	1.5898	1.7944	2.4267	39
37	YBR183W	YPC1	Ceramide metabolism	Ceramidase	1.9808	2.3811	1.7513	40
38	YCR101C		Vacuolar protein sorting	Unknown	1.2093	1.2286	1.8322	37
39	YOR166C		Unknown	Unknown	1.2116	1.513	2.9655	37
40	YDR214W	AHA1	Protein holding	Response to stress	1.7411	1.054	1.7327	36
41	YLR033W	RSC58	Chromatin modeling	Unknown	1.1696	1.1878	1.8393	36

	ORF NAME	GENE NAME	BIOLOGICAL PROCESS	MOLECULAR FUNCTION	0.6 M NaCl	1.2 M NaCl	2.0 M NaCl	% ID
42	YDL138W	RGT2	Signal transduction	Glucosa transporter	1.2648	1.6014	3.1105	35
43	YPL105C		Unknown	Unknown	-1.025	1.159	1.935	35
44	YPR036W	VMA13	Vacuolar acidification	H ⁺ transporting ATPase	1.4693	1.1963	1.6405	35
45	YBL017C	PEP1	Protein-vacuolar targeting	Receptor	1.4281	2.0048	2.3974	33
46	YDR122W	KIN1	Unknown	Ser/thre protein kinase	1.0509	1.3614	2.2395	33
47	YJR110W		Unknown	Phosphatase	1.9589	1.6519	1.7744	33
48	YOR273C	TPO4	Polyamine transport	Spermine transporter	1.0428	1.263	2.1122	33
49	YER001W	MNN1	O-linked glycosylation	Alpha-1,3-mannosyltransferase	1.428	1.4277	2.1207	32
50	YML049C	RSE1	mRNA splicing	U2 snRNA binding	1.1035	1.1468	1.8975	32
51	YNL326C		Unknown	Unknown	1.5852	1.132	2.2798	32
52	YDR367W		Unknown	Unknown	1.7045	1.707	2.3576	30
53	YBR274W	CHK1	Cell cycle	Ser/thre protein kinase	1.4227	1.6562	1.7286	28
54	YCR073C	SSK22	Protein amino acid phosphorylation	MAPKKK	1.519	1.0022	1.8539	28
55	YHR060W	VMA22	ATPase protein complex assembly	Glycogen metabolism	1.0431	1.1611	1.6576	27
56	YIL130W	GIN1	Unknown	Unknown	-1.039	1.361	1.7228	26
57	YPL248C	GAL4	Regulation transcription	Transcriptional activator	-1.235	-1.1307	2.3295	23
58	YAL032C	PRP45	Positive regulation of transcription	Transcriptional activator	1.9053	1.9146	2.2788	
59	YAR060C		Unknown	Unknown	1.2055	1.0861	1.6601	
60	YAL055W	PEX22	Protein-peroxisome targeting	Unknown	2.3577	2.1887	3.9326	
61	YAR070C		Unknown	Unknown	2.4174	1.5679	2.8391	
62	YBL012C		Unknown	Unknown	2.528	2.1492	2.4749	
63	YBL015W	ACH1	Acetate metabolism	Acetyl-CoA hydrolase	-1.494	-1.0334	1.735	
64	YBL018C	POP8	rRNA processing	Ribonuclease P	1.2238	1.3314	1.5143	

	ORF NAME	GENE NAME	BIOLOGICAL PROCESS	MOLECULAR FUNCTION	0.6 M NaCl	1.2 M NaCl	2.0 M NaCl	% ID
65	YBL041W	PRE7	Ubiquitin-dependent protein catabolism	Proteasome endopeptidase	-1.571	-1.0591	2.4086	
66	YBL042C	FU11	Uridine transport	Uridine transporter	1.1111	1.0023	1.8856	
67	YBL043W	ECM13	Cell wall organization and biogenesis	Unknown	1.6794	2.5496	2.2416	
68	YBL066C	SEF1	Unknown	Unknown	-1.09	1.4662	1.6239	
69	YBL087C	RPL23A	Protein biosynthesis	Structural constituent of ribosome	1.2243	1.374	2.669	
70	YBL113C		Unknown	Unknown	1.0456	-1.1144	2.1295	
71	YBR020W	GAL1	Galactose metabolism	Galactokinase	-1.001	1.4408	1.6122	
72	YBR040W	FIG1	Cellular morphogenesis with cellular fusion	Unknown	-1.426	-1.0194	1.6907	
73	YBR050C	REG2	Negative regulation of transcription	Protein phosphatase type 1	1.3711	1.3478	2.6577	
74	YBR052C		Unknown	Unknown	1.0947	1.054	2.0674	
75	YBR107C	IML3	Chromosome segregation	Unknown	1.0731	1.6711	1.6511	
76	YBR111C	YSA1	Unknown	Phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase	1.0351	1.1137	1.4703	
77	YBR155W	CNS1	Protein holding	Chaperone	1.5049	4.1251	3.7729	
78	YBR157C	ICS2	Unknown	Unknown	1.5687	1.905	2.389	
79	YBR178W		Unknown	Unknown	1.7854	2.5142	3.9193	
80	YBR226C		Unknown	Unknown	1.7558	1.3832	2.2121	
81	YBR228W	SLX1	DNA repair	endonuclease activity	1.5815	1.5774	2.1998	
82	YBR230C		Unknown	Unknown	1.6752	2.2252	2.1588	
83	YBR232C		Unknown	Unknown	1.3154	1.476	2.3459	
84	YBR250W		Unknown	Unknown	1.1011	1.2672	1.657	
85	YCL023C		Unknown	Unknown	1.2126	1.0937	1.6042	
86	YBR253W	SRB6	Transcription from Pol II promoter	RNA polymerase II	1.3343	1.3595	1.8375	

	ORF NAME	GENE NAME	BIOLOGICAL PROCESS	MOLECULAR FUNCTION	0.6 M NaCl	1.2 M NaCl	2.0 M NaCl	% ID
87	YCL026CA	FRM2	Negative regulation of fatty acid metabolism	Unknown	1.0554	1.36	2.1945	
88	YCL047C		Unknown	Unknown	1.4647	1.2836	1.9106	
89	YCL049C		Unknown	Unknown	1.5092	1.9902	2.9861	
90	YCL051W	LRE1	Cell wall organization and biogenesis	Transcription regulator	-1.149	1.4523	2.2457	
91	YCR008W	SAT4	Cation homeostasis	Protein kinase	-1.145	-1.0012	1.6006	
92	YCR022C		Unknown	Unknown	1.0335	1.0293	1.7846	
93	YCR048W	ARE1	Sterol metabolism	Sterol O-acyltransferase	-1.083	1.7529	4.7636	
94	YCR063W	BUD31	Bud site selection	Unknown	1.4376	1.4196	1.5942	
95	YCR073A	SOL2	tRNA processing	6-phosphoglucono lactonase activity	1.1567	1.2263	2.0586	
96	YCR076C		Unknown	Unknown	-1.095	1.1091	1.6716	
97	YCR099C		Unknown	Unknown	1.3701	1.5728	4.5424	
98	YCR100C		Unknown	Unknown	-1.216	-1.021	1.559	
99	YDL014W	NOP1	rRNA modification	snoRNA binding	1.5179	1.6319	2.4825	
100	YDL041W		Unknown	Unknown	1.2778	1.1795	1.804	
101	YDL015C	TSC13	Very-long-chain fatty acid metabolism	Oxidoreductase	-1.143	1.0066	1.8569	
102	YDL045C	FAD1	FAD biosynthesis	FMN denlyltransferase	1.2156	1.2264	2.2301	
103	YDL063C		Unknown	Unknown	1.0799	1.2351	1.8249	
104	YDL061C	RPS29B	Protein biosynthesis	Structural constituent of ribosome	1.229	1.2994	2.125	
105	YDL068W		Unknown	Unknown	1.1075	1.4264	1.8374	
106	YDL116W	NUP84	mRNA-nucleus export	Structural molecule	1.5437	2.5463	3.0265	
107	YDR010C		Unknown	Unknown	-1.096	1.0982	2.6041	
108	YDL090C	RAM1	Protein amino acid farnesylation	Protein farnesyltransferase	1.437	1.7756	3.0836	

	ORF NAME	GENE NAME	BIOLOGICAL PROCESS	MOLECULAR FUNCTION	0.6 M NaCl	1.2 M NaCl	2.0 M NaCl	% ID
109	YDL132W	CDC53	Ubiquitin-dependent protein catabolism	Structural molecule	1.9224	2.1987	4.4593	
110	YDL208W	NHP2	rRNA modification	RNA binding	1.1695	1.1218	2.0876	
111	YDL160C	DHH1	Deadenylation-dependent decapping	Protein binding	3.4736	1.3664	2.0115	
112	YDR004W	RAD57	Double-strand break repair	Protein binding	-1.049	1.5657	4.8196	
113	YDR007W	TRP1	Tryptophan biosynthesis	phosphoribosylanthranilate isomerase	1.4195	1.8006	2.5848	
114	YDR009W	GAL3	Regulation of transcription, DNA-dependent	Unknown	1.8621	1.4116	3.1618	
115	YDR076W	RAD55	Double-strand break repair	Protein binding	-1.046	1.0892	1.9001	
116	YDR148C	KGD2	Tricarboxylic acid cycle	Dihydropyrimidinase S-succinyltransferase	1.3025	1.3455	2.4193	
117	YDR189W	SLY1	ER to Golgi transport	SNARE binding	1.5824	2.4595	2.4011	
118	YDR190C	RVB1	Regulation of transcription	ATPase	-1.122	1.1957	2.6647	
119	YDR193W		Unknown	Unknown	1.7201	1.7823	4.3143	
120	YDR210D		Unknown	Unknown	1.5898	2.3361	3.5509	
121	YDR232W	HEM1	Heme biosynthesis	Actin cross-linking	1.6266	1.4551	2.3832	
122	YDR255C	RMD5	Unknown	Unknown	1.2784	1.7246	1.6709	
123	YDR260C	SWM1	Spore wall assembly	Unknown	1.357	1.4902	4.9645	
124	YDR322A	TIM11	ATP synthesis coupled proton transport	Structural molecule	1.4433	1.3924	1.6874	
125	YDR365B		Unknown	Unknown	1.2036	1.4648	2.7232	
126	YDR366C		Unknown	Unknown	-1.287	-1.2691	2.0069	
127	YDR413C		Unknown	Unknown	-1.016	1.2794	1.7518	
128	YDR466W	PKH3	MAPKK cascade	Protein kinase activity	-1.23	-1.1121	1.7929	
129	YDR488C	PAC11	Microtubule-based process	Microtubule motor	-1.193	-1.0854	1.9173	
130	YDR490C	PKH1	Protein amino acid phosphorylation	Protein kinase	-1.045	-1.2357	1.7709	

	ORF NAME	GENE NAME	BIOLOGICAL PROCESS	MOLECULAR FUNCTION	0.6 M NaCl	1.2 M NaCl	2.0 M NaCl	% ID
131	YDR533C	HSP31	Unknown	Chaperone activity	1.0572	1.2721	2.2557	
132	YEL007W	TOS9	Unknown	Unknown	1.6312	1.5452	1.5511	
133	YEL015W	EDC3	Unknown	Unknown	1.2622	1.9026	5.132	
134	YEL011W	GLC3	Glycogen metabolism	1,4-alpha-glucan branching enzyme	1.4425	2.0473	1.5586	
135	YEL012W	UBC8	Polyubiquitination	Ubiquitin conjugating enzyme	2.5884	2.5055	3.9402	
136	YEL017W	GTT3	Glutathione metabolism	Unknown	1.5225	2.024	2.8684	
137	YER004W	FMP52	Unknown	Unknown	2.2621	3.0597	4.6302	
138	YEL037C	RAD23	Nucleotide-excision repair	Damaged DNA binding	1.2074	1.5402	2.0992	
139	YER113C		Unknown	Unknown	2.008	1.954	2.6698	
140	YER116C	SLX8	DNA recombination	DNA binding	1.3218	2.6319	4.9995	
141	YER117W	RPL23B	Protein biosynthesis	Structural constituent of ribosome	1.0286	1.1067	1.8685	
142	YER118C	SHO1	Pseudohyphal growth	Osmosensor	1.5461	1.7834	1.9727	
143	YER181C		Unknown	Unknown	1.4793	1.5731	2.1922	
144	YER183C	FAU1	Folic acid and derivative biosynthesis	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	1.3925	1.4831	1.9237	
145	YFL023W	BUD27	Bud site selection	Unknown	1.2641	1.298	1.8822	
146	YFR011C		Unknown	Unknown	1.1152	-1.0019	1.5086	
147	YFR036W	CDC26	Ubiquitin-dependent protein catabolism	Protein binding	-1.24	1.4763	1.5548	
148	YGL005C	COG7	Intra-Golgi transport	Unknown	-1.219	1.0289	2.4371	
149	YGL047W		Unknown	Transferase activity	1.4425	2.0472	5.8154	
150	YGL069C		Unknown	Unknown	1.0572	1.1597	1.5037	
151	YGL027C	CWH41	Cell wall organization and biogenesis	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	-1.222	1.274	2.3685	
152	YGL051W	MST27	Vesicle organization and biogenesis	Protein binding	-1.224	1.0217	1.9395	

	ORF NAME	GENE NAME	BIOLOGICAL PROCESS	MOLECULAR FUNCTION	0.6 M NaCl	1.2 M NaCl	2.0 M NaCl	% ID
153	YGL053W	PRM8	Conjugation with cellular fusion	Unknown	1.1355	1.1038	2.1561	
154	YGL165C		Unknown	Unknown	1.1478	-1.0479	1.6194	
155	YGL216W	KIP3	Mitotic spindle assembly	Microtubule motor	1.2151	1.3955	1.8607	
156	YGL239C		Unknown	Unknown	1.117	1.7446	2.303	
157	YGL242C		Unknown	Unknown	1.0039	2.6531	2.6632	
158	YGR039W		Unknown	Unknown	1.6299	1.403	1.6189	
159	YGR045C		Unknown	Unknown	-1.284	-1.0515	2.1849	
160	YGR091W	PRP31	mRNA splicing	Pre-mRNA splicing factor	1.5579	1.3718	2.3581	
161	YGR132C	PHB1	Proteo and peptidolysis	Unknown	1.0282	1.3142	1.4952	
162	YGR136W	LSB1	Unknown	Unknown	1.1513	1.7447	2.6723	
163	YGR248W	SOL4	Unknown	Unknown	1.6673	1.6965	1.6276	
164	YGR282C	BGL2	Cell wall organization and biogenesis	Glucan 1,3-beta-glucosidase	-1.06	1.2024	1.8985	
165	YHR041C	SRB2	Transcription from Pol II promoter	RNA polymerase II	1.9255	1.831	1.6138	
166	YHR067W	RMD12	Unknown	Unknown	1.6044	1.3547	1.5477	
167	YHR087W		Unknown	Unknown	2.2098	2.6785	2.5308	
168	YHR111W	UBA4	Protein modification	URM1 activating enzyme	1.4173	1.5071	1.7631	
169	YHR197W	IP12	Unknown	Unknown	1.2998	1.5393	2.0667	
170	YIL097W	FYV10	Negative regulation of gluconeogenesis	Unknown	2.1556	1.6518	2.3302	
171	YIL120W	QDR1	Multidrug transport	Multidrug transporter	1.2621	1.1527	1.5906	
172	YIR019C	MUC1	Pseudohyphal growth	Signal transducer	1.398	1.3147	1.581	
173	YIL122W	POG1	Re-entry into mitotic cell cycle	Specific RNA polymerase II	1.3112	1.2728	1.6679	
174	YIL145C	PAN6	Pantothenate biosynthesis	Pantoate-beta-alanine ligase	1.5443	1.3263	1.5269	

	ORF NAME	GENE NAME	BIOLOGICAL PROCESS	MOLECULAR FUNCTION	0.6 M NaCl	1.2 M NaCl	2.0 M NaCl	% ID
175	YJR038C	GTT1	Glutathione metabolism	Glutathione transferase	1.9188	1.8471	4.5408	
176	YJL067W		Unknown	Unknown	1.7568	1.2848	1.6574	
177	YJL105W	SET4	Unknown	Unknown	2.1459	2.3118	1.6502	
178	YJR060W	CBF1	Methionine biosintesis	DNA binding	1.2861	1.6362	2.4987	
179	YJL141C	YAK1	Protein amino acid phosphorylation	Protein kinase	2.8285	2.9652	2.5823	
180	YJR108W	ABM1	Microtubule cytoskeleton organization	Unknown	1.0434	-1.2451	1.9957	
181	YKL195W	FMP15	Protein targeting	Unknown	1.973	1.5256	2.1815	
182	YKR030W	MSG1	Transport	Unknown	1.6683	1.6269	2.1207	
183	YKR024C	DBP7	35S primary transcript processing	ATP dependent RNA helicase	1.7055	1.4415	1.7808	
184	YKR029C	SET3	Histone deacetylation	NAD-dependent histone deacetylase	1.7118	1.373	1.5885	
185	YKR047W		Unknown	Unknown	1.2644	1.451	2.3696	
186	YKR057W	RPS21A	Protein biosintesis	Structural constituent of ribosome	-1.146	1.0667	1.7725	
187	YKR070W		Unknown	Unknown	1.7727	1.1471	1.7022	
188	YLL051C	FRE6	Unknown	Ferric-chelate reductase	1.2667	1.3904	1.4244	
189	YLR031W		Unknown	Unknown	1.0587	1.3871	1.5131	
190	YLR128W		Unknown	Unknown	1.2298	1.0667	1.6739	
191	YLR149C		Unknown	Unknown	1.0639	1.2849	1.8062	
192	YLR192C	HCR1	Protein biosintesis	Translation initiation factor	1.3369	1.2891	1.9359	
193	YLR204W	QRI5	Unknown	Unknown	1.3674	1.2299	1.6613	
194	YLR133W	CKI1	Phosphatidylcholine biosintesis	Choline kinase	1.3772	1.286	1.7024	
195	YLR254C		Unknown	Unknown	1.39	1.4413	1.8484	
196	YLR264W	RPS28B	Protein biosintesis	Structural constituent of ribosome	-1.005	1.1261	1.6087	

	ORF NAME	GENE NAME	BIOLOGICAL PROCESS	MOLECULAR FUNCTION	0.6 M NaCl	1.2 M NaCl	2.0 M NaCl	% ID
197	YLR315W	NKP2	Unknown	Unknown	2.3052	1.5564	1.9249	
198	YLR301W		Cotranslational membrane targeting	Unknown	1.1828	1.2844	1.6036	
199	YLR313C	SPH1	Establishment of cell polarity	Cytoskeletal regulatory protein binding	1.5669	1.3828	2.1877	
200	YLR363C	NMD4	mRNA catabolism	Unknown	1.5423	1.7784	2.317	
201	YLR371W	ROM2	Cell wall organization	Signal transducer	1.1977	1.0734	1.5487	
202	YML053C		Unknown	Unknown	1.11	1.2491	1.5838	
203	YML058W	SML1	Mitochondrion organization	Enzyme inhibitor	1.2945	1.2807	1.569	
204	YML058A	HUG1	Response DNA damage	Unknown	1.1001	1.5121	1.6046	
205	YML076C	WAR1	Unknown	Unknown	1.3287	1.2788	1.8075	
206	YMR036C	MIH1	G2/M transition of mitotic cell cycle	Protein tyrosine phosphatase	1.8384	1.4811	1.8411	
207	YMR130W		Unknown	Unknown	1.3124	1.4347	2.2134	
208	YMR151W	YIM2	Unknown	Unknown	2.0729	2.2123	2.5089	
209	YMR193A		Unknown	Unknown	2.0213	1.3115	2.0604	
210	YMR212C	EFR3	Cellular morphogenesis	Unknown	1.176	1.42	1.8525	
211	YMR215W	GAS3	Unknown	Unknown	1.1559	1.3817	1.8126	
212	YMR217W	GUA1	GMP metabolism	GMP synthase	1.1493	1.3392	1.5769	
213	YOL134C		Unknown	Unknown	1.0455	1.1667	1.9852	
214	YNL100W		Unknown	Unknown	1.3327	1.3051	1.4309	
215	YNL067W	RPL9B	Protein biosynthesis	Structural constituent of ribosome	1.0674	1.1697	1.839	
216	YNL146W		Unknown	Unknown	1.4219	1.5955	1.6704	
217	YNL169C	PSD1	Phosphatidylcholine biosynthesis	Phosphatidylserine decarboxylase	1.3199	1.3116	1.9635	
218	YNL171C		Unknown	Unknown	1.5422	1.8355	1.9366	
219	YNR009W		Unknown	Unknown	1.0824	1.1291	1.9405	

	ORF NAME	GENE NAME	BIOLOGICAL PROCESS	MOLECULAR FUNCTION	0.6 M NaCl	1.2 M NaCl	2.0 M NaCl	% ID
220	YOL130W	ALR1	Di, tri valent inorganic cation transport	Di, tri valent inorganic cation transporter	1.0714	1.0032	1.845	
221	YOL152W	FRE7	Unknown	Ferric-chelate reductase	1.211	1.017	1.5393	
222	YOR082C		Unknown	Unknown	1.0078	1.0299	1.6417	
223	YOR283W		Unknown	Unknown	2.6941	2.4381	2.1599	
224	YOR245C	DGA1	Triacylglycerol biosynthesis	Diacylglycerol O-acyltransferase	1.2304	1.267	1.7029	
225	YOR251C		Unknown	Thiosulfate sulfotransferase	-1.047	1.0681	1.6364	
226	YPL060CA		Unknown	Unknown	1.0315	1.1176	1.7111	
227	YPL179W	PPQ1	Protein amino acid dephosphorylation	Protein ser/thre phosphatase	1.4612	1.6182	1.782	
228	YPL233W	NSL1	Chromosome segregation	Unknown	1.0793	1.2083	1.7065	
229	YPL235W	RVB2	Regulation of transcription	ATPase	-1.006	1.0179	1.5982	
230	YPL252C	YAH1	Heme a biosynthesis	electron transfer carrier	1.4093	1.5789	1.9222	
231	YPR104C	FHL1	rRNA processing	Transcription factor	1.505	2.6285	2.931	
232	YPR115W		Unknown	Unknown	1.2265	1.0935	1.661	
233	YPR149W	NCE102	Protein secretion	Unknown	1.4769	1.2101	2.2043	
234	YPR183W	DPM1	N-linked glycosylation	Transferase glycosyl groups	-1.007	1.1551	1.9815	
235	YPR197C		Unknown	Unknown	1.0276	1.1467	1.5135	

Los genes que no tienen porcentaje de identidad fueron aquellos que no tienen homología con *D. hansenii* en la base de datos consultada.