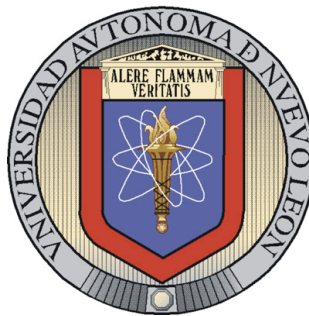


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**PERFIL DE EXPRESIÓN DEL GENOMA DE  
*Debaryomyces hansenii* EN RESPUESTA A LA OSMOADAPTACIÓN**

POR

**NANCY ARROYO GONZALEZ**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de Doctor en Ciencias  
con Especialidad en Biotecnología**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L.

ABRIL DE 2009

**PERFIL DE EXPRESIÓN DEL GENOMA DE  
*Debaryomyces hansenii* EN RESPUESTA A LA OSMOADAPTACIÓN**



**Como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
con Especialidad en Biotecnología**

**POR**

**NANCY ARROYO GONZALEZ**

**Comité de Tesis**

**Dr. Hugo Alberto Luna Olvera**  
Director de Tesis

**Dra. Lilia Hortensia Morales Ramos**  
Secretario

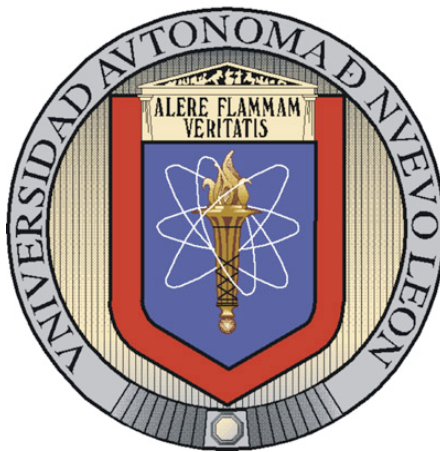
**Dr. Benito Pereyra Alférez**  
Vocal

**Dra. Martha Guerrero Olazarán**  
Vocal

**Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna**  
Vocal

**Dr. Govind S. Nadathur**  
Director Externo

**ABRIL 2009**



ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. HUGO ALBERTO LUNA OLVERA EN EL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, PERTENECIENTE A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN , MEXICO Y DEL DR. GOVIND S. NADATHUR EN EL LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MARINAS DEL RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGUEZ , PUERTO RICO.

## AGRADECIMIENTOS

Al Ing. José Antonio González Treviño, Rector de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y al Dr. Jorge I. Vélez Arocho, Rector del Recinto Universitario de Mayagüez-Universidad de Puerto Rico por su espíritu de alianza el cual se hizo tangible en el convenio entre ambas instituciones universitarias. Gracias por facilitar este convenio y su disponibilidad en renovarlo cuando se hizo necesario. Ese convenio fue clave para lograr mis metas profesionales en esta mi querida Alma Mater, la UANL.

A las Sra. Rosy Palacios (Escolar), la Lic. Emma Melchor y Lupita Hernández (Intercambio Académico), la claridad y seriedad con que atendieron mis preguntas interminables y como no me desampararon en momentos de duda, exige de mi un agradecimiento sincero y una oración para que Dios las recompense. ¡Que muchos estudiantes puedan tener una experiencia tan positiva como la mía!

Al Dr. Jesús Ancer Rodríguez, Dr. Carlos Medina y al Dr. José Ignacio Rojas por toda su ayuda y serio esfuerzo en lograr que se honrara el convenio entre las dos universidades. Se pueden escribir documentos importantes pero es necesario contar con los instrumentos que comprendan el significado de éstos y hagan su misión que dichos documentos cobren vida para el bien de muchos. Esta fue mi experiencia cuando necesité su ayuda. Gracias! Dios siga iluminándolos en todas sus tareas profesionales y personales.

Mil gracias a Posgrado, especialmente a la Dra Diana Reséndez, a el Dr. Pablo Zapata y a las Sras. Yadira y Carmen por su profesionalismo, disponibilidad, su paciencia en dirigir mis pasos por el camino al doctorado.

Biología es la Tecnología al Servicio de la Vida. Que regalo me hizo Dios en darme la oportunidad de ser parte del Instituto de Biotecnología de la UANL. El ejemplo, el apoyo y el cariño que ustedes me han brindado, los profesores, los empleados no docentes y los estudiantes del Instituto, han sido una manifestación del amor de Dios. Hay quienes pasan por nuestras vidas y tienen tal impacto, dejan huellas y no podemos evitar ser mejores personas gracia a ellos.

Dr. Hugo: How can I thank you? You've been selfless, generous, noble! From the first moment that you invited me to come to your lab, you had such a clear vision of the benefits and challenges this project would present. You helped me face those challenges with courage. May our dear Lord and our Lady of Guadalupe reward you and your dear family richly.

Dr. Galán: Su amistad con el Recinto Universitario de Mayagüez y de manera especial con el Dr. Govind Nadathur, ha abierto puertas y ha construido puentes entre los dos países, entre las dos universidades. Gracias por ayudarme a conseguir las ayudas

económicas que necesité. Mi comunidad de Hermanas de María de Schoenstatt están sumamente agradecidas.

Dra. Kati: Usted inició en enero el proceso para poder presentar este año. Sus llamadas a Puerto Rico, sus llamadas estratégicas en la UANL, su disponibilidad para ayudarme en todo, han sido tan y tan valiosas. Nunca olvidaré su preocupación y delicadeza tan grande en agradecer a todos los que nos ayudaron en este proceso. Gracias por su ejemplo!

Dra Lili: que rol tan importante ha tenido usted como encargada del programa doctoral en esta experiencia profesional que me ha tocado vivir en la UANL y más específicamente en el Instituto de Biotecnología. Siempre tan fina, tan amable y tan serena! Gracias Dra.!!!

Mi comité de tesis: Dr. Benito, Dra. Martha, Dra. Lili, Dr. Carlos Hernández gracias por su ayuda, su amistad, su orientación en este trabajo. Gracias especiales a la Dra. Martha por el tiempo que dedicó a la revisión y discusión del trabajo.

Isela: que regalo Dios me ha hecho en poder contar contigo en este tiempo que he vivido y estudiado en Monterrey. Has sido una verdadera hermana para mí, detallista, disponible para brindarme cualquier ayuda en el plano personal o profesional y mas aun anticipaste tantas veces lo que necesitaba. Que regalo haber podido compartir contigo la espiritualidad de Schoenstatt. Gracias por compartir tu hogar y familia conmigo!

Angélica: De verdad has sido un ángel para mí, cuidando de mí, ofreciéndome tu hogar, tu oficina, tu tiempo. Que bueno que pudimos compartir tantas alegrías, y peticiones especiales también la riqueza de nuestra fe católica! Gracias amiguita!

Cristina: Como agradecer tu disponibilidad en ayudarme con todo el proceso de titulación, que Dios recompense tu amabilidad con ricas bendiciones para los tuyos.

Maestras Miriam, Lupita, Maestro Carlos Sandoval, Maestro Tomás, a todos, gracias por su apoyo, por animarme y por alegrarse conmigo cada vez que dábamos un paso adelante.

Dr. Hugo Gallardo: Infinita gracias por ayudarme a traducir las diferentes partes de la tesis al español. Cuando llegué a Monterrey había escrito todo en ingles y me asuste muchísimo ante el reto de traducirlo, especialmente todos los términos moleculares. Pero usted me animó, y poco a poco se tradujo y se corrigió todo. Gracias y Dios lo bendiga!

A mi pequeña familia en el laboratorio de biología molecular en Isla Magueyes:

Govind: You conceived this project in all its details. I look back and remember all the points in the agenda and I can thankfully say all of them have become true: giving myself a second chance in research, the 2 papers, the PhD., lasting friends...and many more things. Thank you for believing in me, for directing this work to its happy and successful completion.

Jas: Thank you little sister for all we have shared: science, friendship, dreams, crosses, joys and our love of God that kept us hoping that we can do all things in Him who strengthen us. Thank you for anticipating any help I might have needed. God bless you sis'.

Annie B: What a wonderful experience to have met you! I marveled at God's gifts to you as a scientist and as an artist. Thank you for putting those talents at my disposal. May God reward and bless you.

Bill: I had the privileged that you shared with me science, everyday wisdom, joys and the daily gratitude to our Father in heaven for his blessings. What a wonderful atmosphere! Thanks!

Aixin: Que bueno que Dios permitió que compartiéramos una vez mas. Que nos regale muchas oportunidades más. Gracias por tu apoyo y tu alegría!

Carlos Acevedo: My dear brother and friend, colleague and mentor. Thank you for helping me believe that this huge project could be done. Thank you for the many hours spent helping me, for your financial help to my community and your love and respect for my vocation.

Josean Frontera: Gracias por tu amistad, tu apoyo en todo este proceso y de manera especial por todo lo que hiciste en la revisión del Convenio entre el RUM y la UANL.

Nora Soto: ¡ Que admirable eres ! Que bueno poder contar contigo siempre en todos estos años en el RUM y de manera especial cuando mas te necesité en México especialmente para que le dieras seguimiento al documento del convenio. Gracias!

A mi querida familia de Schoenstatt en Puerto Rico y de manera especial a la Dra. Myriam Vargas, Don Hiram y Doña Evelyn Quiñones , Yolanda Vélez, mi comité de maestría y doctorado por su generosidad material y espiritual. A la "Primera Legión" : Ronnie y Chave Rojas, Padre Carlos José, Pedro y Lily, Adolfo y Lourdes, Lilliam y Rubén por las oraciones y capital de gracias.

A la familia de Schoenstatt en Monterrey y de manera especial a Padre Marcel, Doña Luvy y Cesar por cuidar de mí en mi estadía en Monterrey. Me ayudaron a darme cuenta que el mundo cada vez es mas pequeño y nuestra Familia de Schoenstatt cada vez mas grande y mas unida. Que la Mater los recompense!

## **Dedicatoria**

A Dios Padre por su misericordia con su hija. Estoy conciente que no siempre escoges a los capacitados, pero me ha tocado vivir, como **siempre capacitas aquellos que escoges**. Que yo nunca olvide lo que PhD. Significa para mi: Padre hazme digna!

A la Madre de Dios bajo la advocación de:

-Madre y Reina de Schoenstatt, Reina del “Nada sin ti, Nada sin nosotros”. “De mi que hubiese sido sin tu amor... Te lo agradezco Madre sin cesar!

-A la Guadalupana, Reina de México, que me atrajo hasta el Tepeyac para que entendiera que para todo hijo de María ser Guadalupano es algo esencial!

A las Hermanas de María de Schoenstatt, en Wisconsin, Puerto Rico y Querétaro. Sus oraciones, sus contribuciones al Capital de Gracias, su confianza en mi han sido el secreto del éxito de esta “aventura” y reto profesional. Que todo sea una contribución a la canonización de nuestro Padre y Fundador.

A mi familia, Mami, Walter, Juni, Grey y fam, Edgardo y las nenas, Marta María y Joselito, mis sobrinos (especialmente Davidcito y Giselle, J.Carlos y Arlene, y Alex Joel con sus mensajitos electrónicos de apoyo), mis sobrinas y sus familias. Gracias por su apoyo, su orgullo, su alegría.

De manera especial gracias a David y Angie por todo lo que se sacrificaron por ayudarme y a mi comunidad de Hermanas. ¡Dios recompense cada esfuerzo, cada detalle de amor y cada paso que dieron conmigo! ¡Este trabajo va dedicado a ustedes!

**“Sois la sal de la tierra” (Mt. 5, 13)**

**“El Reino de los Cielos es como la levadura” (Mt. 13,33)**

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN Y ABSTRACT .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	3
3. HIPÓTESIS .....	6
4. OBJETIVO .....	7
4.1 Objetivo general .....	7
4.2 Objetivos particulares .....	7
5. ANTECEDENTES .....	8
5.1 Levaduras como modelos eucarióticos .....	8
5.2 Estrés salino en levaduras .....	9
5.3 Osmoregulación/Osmoadaptación .....	10
5.4 Halotolerancia .....	11
5.5 Respuestas celulares en levaduras asociadas a la osmoadaptación .....	12
5.5.1 Pared Celular .....	12
5.5.2 Membrana.....	13
5.5.3 Ribosomas .....	14
5.6 <i>D. hansenii</i> - Sistema modelo para estudiar halotolerancia.....	15
5.7 <i>D. hansenii</i> - Sistema modelo para estudiar osmoregulación.....	16
5.7.1 Mecanismos de osmotolerancia en <i>D. hansenii</i> .....	17
5.7.1.1 Solutos Compatibles: Glicerol, Arabitol y Trealosa.....	17
5.7.1.2. Rutas metabólicas involucradas en respuesta al estrés salino.....	18
5.7.1.3. Transporte de Iones en condiciones de estrés salino.....	20
5.7.1.4. Rol de las ATPasas en el transporte de iones en condiciones de estrés salino.....	20
5.8 El análisis funcional del genoma de la levadura provee nuevas herramientas....	21
5.8.1. El genoma nuclear de <i>S. cerevisiae</i> .....	21
5.8.2 El genoma de <i>D. hansenii</i> .....	22
5.9 Abordaje genético-visión panorámica del genoma .....	23
5.9.1 Antecedentes históricos.....	23
5.9.2 Respuesta Transcripcional en levaduras al estrés salino.....	24
6.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.1 Cepas de levaduras y condiciones de crecimiento .....	26
6.2 Diseño de sondas y de microrreglos de expresión génica .....	26
6.3 Extracción de ARN total .....	28
6.4 Síntesis y purificación de ARNc fluorescente.....	29
6.5 Protocolo de hibridación y lavado .....	30
6.6 Procesamiento de datos y análisis estadísticos .....	31



6.7 Diseño de iniciadores para PCR en tiempo real .....	34
6.8 Experimentos de PCR en tiempo real .....	35
7.0 RESULTADOS .....	38
7.1 Expresión génica diferencial en <i>D. hansenii</i> .....	38
7.2 Análisis de gráficas tipo volcán.....	41
7.3 Análisis del diagrama de Venn .....	44
7.4 Análisis de niveles de expresión utilizando grafica de barra .....	44
7.5 Clasificación funcional de genes en una grafica circular.....	47
7.6 Análisis del patrón de expresión.....	48
7.7 Validación de los genes ENA1 y HWP1 utilizando qRT-PCR.....	52
8.0 DISCUSIÓN.....	58
8.1 Biosíntesis de glicerol y osmoadaptación.....	59
8.2 Proteínas ribosomales.....	61
8.3 Otros genes .....	64
8.3.1 Genes con incremento en su expresión .....	64
8.3.2 Genes con disminución en su expresión .....	65
8.3.3 Genes no caracterizados .....	65
9.0 CONCLUSIONES.....	68
10.0 LITERATURA CITADA .....	70
11.0 APÉNDICES	
APÉNDICE A -Tabla 1. Genes de <i>D. hansenii</i> con incremento en su expresión.....	82
APÉNDICE B- Tabla 2. Genes de <i>D. hansenii</i> con disminución en su expresión.....	89

## TABLA

Tabla		Página
1	Respuesta al estrés salino en levaduras medida por la tecnología de microarreglos .....	67

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diseño experimental.....	27
2	Curva de sobrevivencia de <i>D. hansenii</i> CBS 767.....	39
3	Electroforesis representativa y electroferograma.....	40
4	Imagen representativa de hibridaciones y gráficas de volcán.....	42
5	Diagrama de Venn y gráficas de barra de los niveles de expresión.....	45
6	Expresión temporal y funcional del genoma de <i>D. hansenii</i> .....	48
7	Patrones de expresión de genes.....	50

## 1. RESUMEN

La levadura marina *Debaromyces hansenii* constituye una valiosa herramienta como modelo científico dada su resistencia a concentraciones extremas de sal. En la presente investigación abordamos el análisis de expresión del genoma completo de esta levadura mediante la tecnología de microarreglos con el objetivo de identificar genes involucrados en la respuesta transcripcional al estrés osmótico. Para este propósito se examinaron los genes diferencialmente expresados en tres tiempos puntuales (0.5 h, 3 h, y 6 h) después que la cepa de *D. hansenii* CBS767 fue expuesta a NaCl 2M. De los 6,320 genes que comprenden el genoma estudiado, 109 (1.72%) mostraron diferencias significativas en su nivel de expresión, 65 de los cuales, lo incrementaron al menos 3 veces respecto al nivel basal después del tratamiento con sal, mientras que los otros 44 disminuyeron su expresión. Todos los genes diferencialmente expresados se agruparon de acuerdo a sus funciones a fin de identificar los procesos celulares alterados en respuesta al estrés osmótico. Se encontró que poco más de la mitad de los genes que aumentan su expresión al exponerse a las altas concentraciones de NaCl, están relacionados a la síntesis de proteínas ribosomales, por lo cual es muy posible que el mecanismo regulador de traducción tenga una función importante en la respuesta a la osmoregulación de *D. hansenii*. Se realizaron estudios de validación para los genes ENA1 y HWP1 seleccionados en base a su documentada tolerancia al Sodio y a la destacada expresión génica, respectivamente, utilizando la metodología de PCR en tiempo real, donde se confirmaron los mismos patrones de expresión obtenidos mediante la tecnología de microarreglos. Los resultados obtenidos apoyan la noción de que *D. hansenii* esta preadaptada para sobrevivir en ambientes de extrema salinidad en base a la revelación de que solo un limitado número de genes se expresaron diferencialmente en su genoma como una respuesta al estrés osmótico. El presente, es el primer estudio de su clase en *D. hansenii* que provee la base para conocer el proceso de osmoadaptación en esta fascinante levadura, y con ello las implicaciones biotecnológicas futuras que involucran.

**Palabras clave:** *Debaromyces hansenii*, osmoadaptación, genoma completo, microarreglo.

## ABSTRACT

The marine yeast *Debaromyces hansenii* is a model system for the study of processes related to osmoadaptation. In this study, microarray-based gene expression analyses of the entire genome of *D. hansenii* was used to study its response to osmotic stress. Differential gene expression, compared to control, was examined at three time points (0.5 h, 3 h, and 6 h.) after exposure of *D. hansenii* cultures to high salt concentration. Among the 6,320 genes studied, 109 (1.72%) genes showed statistically significant differences in expression, and only 65 genes displayed at least 3-fold increases in mRNA levels after treatment with 2M NaCl. On the other hand, 44 genes showed 3-fold repression. Upregulated as well as the downregulated genes were grouped into functional categories to identify biochemical processes possibly affected by osmotic stress and involved in osmoadaptation. Since more than one-half of the upregulated genes encode for ribosomal proteins, it is possible that a translational gene regulatory mechanism plays a key role in *D. hansenii*'s osmoregulatory response. Validation studies for ENA1 and for Hyphal Wall/Cell Elongation Protein genes using Real Time PCR confirmed patterns of gene expression observed in our microarray experiments. Selection of these genes was based in the well documented tolerance to sodium and the outstanding gene expression results, respectively. The observation that only a limited number of genes are upregulated in *D. hansenii* in response to osmotic stress supports the notion that *D. hansenii* is pre-adapted to survive in extreme saline environments. To our knowledge, this study is the first of its kind in this organism and provides the foundation for future molecular studies assessing the significance of the genes identified here in *D. hansenii*'s osmoadaptation.

**Keywords:** *Debaromyces hansenii*, osmoadaptation, genome-wide, microarray.

## 2. INTRODUCCIÓN

*D. hansenii*, una levadura marina de la clase hemiascomicetales, es unicelular, uninucleada, haploide y fácil de cultivar en el laboratorio. Este organismo puede crecer en presencia de sal a concentraciones de sal hasta 24% (Norkrans, 1966) y comparado a otras levaduras como *Saccharomyces*, *Pichia* y *Candida*, es la más tolerante (Norkrans, 1968; Adler, 1986; Larsson C. *et al.*, 1990). Este organismo es tan versátil en sus capacidades metabólicas que puede crecer favorablemente aún en ausencia de sal, lo que convierte a este organismo en un excelente modelo para estudios de expresión de genes.

La fisiología y bioquímica de tolerancia a la sal en *D. hansenii* han sido bien documentadas (Blomberg y Adler 1992; Breuer y Harms, 2006). El estudio de la osmotolerancia de este organismo es muy ventajoso debido a las enormes aplicaciones biotecnológicas que involucra. La mayoría de los estudios previos se han avocado a la acumulación de osmolitos compatibles en el interior de la célula, en respuesta a altas concentraciones externas de sal (Adler y Gustafsson, 1980; Thomé y Trench, 1999; Guerrero *et al.*, 2005, Thomé, 2005). Otros estudios se han relacionado al transporte de iones (Norkrans y Kylin, 1969), la base fisiológica de la alta tolerancia a la sal (Prista *et al.*, 1997), y al papel que juega la pared celular en los fenómenos de osmoregulación / osmoadaptación (Thomé, 2006).

Por otra parte, muy poco se conoce de los genes involucrados en las rutas metabólicas que regulan el proceso de osmoregulación en *D. hansenii*, y hasta la fecha, se ha logrado aislar solo unos cuantos (Prista *et al.*, 2005). Por ejemplo, Bansal y Mondel (2000), así como Bansal *et al.* (2001) lograron aislar por complementación fenotípica con *S. cerevisiae*, los genes HOG1 y PBS2 pertenecientes a las rutas metabólicas de las proteínas cinasas implicadas en procesos de cambios osmóticos. De igual manera, un gen homólogo a GPD1 (NAD<sup>+</sup> glicerol-3-fosfato deshidrogenasa) fue aislado en *D. hansenii* utilizando la misma técnica (Thomé, 2004). Otro factor limitante en el estudio de este organismo ha sido la imposibilidad de interrumpir dichos genes en *D. hansenii*, y la única alternativa disponible corresponde a la expresión de estos en *S. cerevisiae* como medio para conocer su posible función (Montiel y Ramos, 2007; Prista *et al.*, 2007; Velkova y Sychrova, 2006).

El uso de métodos tradicionales para evaluar la expresión de genes también ha limitado en parte el estudio de los genomas microbianos debido a la lenta generación de datos sobre su funcionamiento. Dos avances científicos relativamente recientes han facilitado de manera significativa el estudio de la expresión de genes y el conocimiento sobre la respuesta de las células a las presiones del entorno que les rodea. El primero de estos avances, se refiere a la disponibilidad de secuencias de genomas completos de muchos organismos, mientras que el segundo está relacionado con el desarrollo de la tecnología de microarreglos, estrategia que ha facilitado el estudio, identificación y clasificación de información obtenida de la expresión simultánea de los miles de genes contenidos en los genomas completos. A este respecto, la reciente conclusión de los

trabajos de secuenciación del genoma completo de *D. hansenii* (Dujon *et al.*, 2004) nos proporciona la oportunidad casi única de realizar investigaciones acerca de la adaptación osmótica que exhibe este organismo. A su vez el uso de la tecnología de microarreglos nos podrá suministrar datos cuantitativos al comparar esa respuesta transcripcional de todos los genes de esta levadura halotolerante, antes y después de ser sometida a estrés osmótico.

En este trabajo, presentamos un análisis global de la expresión génica de *D. hansenii*, en respuesta a estrés osmótico. El presente trabajo constituye el primero en su tipo en el cual se intenta establecer la relación que guarda la expresión de genes en *D. hansenii* con su capacidad de osmotolerancia utilizando microarreglos de expresión, ampliando de esta manera el panorama sobre las potencialidades biotecnológicas a nivel ecológico, industrial y médico.

### **3. HIPÓTESIS**

Mediante el análisis transcripcional utilizando la metodología de microarreglos es posible conocer los genes involucrados en la respuesta a estrés osmótico en *D. hansenii*.



## **4. OBJETIVO**

### **4.1 Objetivo General**

Nuestro objetivo es la obtención de una mejor y más completa comprensión de la respuesta génica al estrés causado por sal en *D. hansenii*, lo cual contribuirá a ampliar la perspectiva que tenemos sobre el papel de esta levadura desde el punto de vista ecológico, médico e industrial.

### **4.2 Objetivos particulares**

1. Estudio de la expresión del genoma completo de *D. hansenii* para identificar genes involucrados en la respuesta transcripcional al estrés osmótico.
2. Clasificación de genes mostrando aumento o disminución en su expresión en respuesta al estrés osmótico.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1 Levaduras como modelos eucarióticos

Las levaduras han sido un importante organismo modelo para la investigación en biología celular moderna, para el estudio de sistemas eucariontes, y ha sido el microorganismo eucarionte más estudiado. Su facilidad para cultivarlas, junto con las nuevas herramientas en la biología molecular y las numerosas características que comparten con otros organismos multicelulares hacen de estas, organismos accesibles para la investigación. Su importancia es realzada debido a la gran cantidad de información obtenida del genoma (Couto da Silva Graça, 2004). A esto se le añade que el genoma completo de *Saccharomyces cerevisiae* fue secuenciado (Goffeau *et al.*, 1996) haciendo posible el estudio de la fisiología celular en eucariotas.

Los mecanismos de osmoadaptación son de los procesos fisiológicos más estudiados (Hohmann, 2002) en las diferentes especies de levaduras. Debido al interés industrial y el avance de herramientas genéticas, *S. cerevisiae* ha sido el sistema más utilizado (Hohmann, 2002), sin embargo, el estudio de las vías de señalización involucradas en la osmoadaptación ha sido complementado por los resultados obtenidos en *Schizosaccharomyces pombe* los cuales se ha reportado que están más asociados a organismos superiores (Couto da Silva Graça, 2004). La osmoadaptación también ha sido estudiada en el patógeno *Candida albicans* por su relevancia biomédica (Bahn y Sundtrom,

2001). En el campo de la biotecnología de proteínas recombinantes, los sistemas de expresión de *Pichia pastoris* han encontrado gran aceptación en la producción de proteínas para su aplicación en diferentes campos como el área de acuicultura (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2004) entre otros. Finalmente, *Debaryomyces hansenii* ha llamado mucha la atención en el estudio de la osmoadaptación por ser una levadura moderadamente halofílica que crece óptimamente entre 3-15% p/v de NaCl (Breuer y Harms, 2006), pero que puede ser capaz de tolerar niveles que alcanzan hasta 24%, en contraste a *S. cerevisiae* cuyo crecimiento se ve impedido por una salinidad de 10% (Blomberg y Adler, 1992). Es precisamente esa capacidad de osmotolerancia la que destaca este organismo, el cual es actualmente considerado como un extremófilo con un gran potencial biotecnológico (Breuer y Harms, 2006).

## **5.2 Estrés salino en levaduras**

El estudio de los mecanismos fisiológicos y moleculares involucrados en la osmoregulación y osmoadaptación en levaduras es fundamental e importante en la biotecnología y la agricultura (Bohnert *et al.*, 1995). De los factores más limitantes por ejemplo en el crecimiento de plantas están la sequía y exceso de salinidad en el terreno (Serrano *et al.* 1999). La salinidad afecta más del 40% de las tierras más productivas del mundo. De ahí la importancia de entender los mecanismos involucrados en la tolerancia a la sal y la homeostasis de iones y el impacto de estos en la agricultura, en la industria de alimentos y mejores métodos de preservación de éstos (Couto da Silva Graça, 2004). A través de los años, los estudios sobre levaduras ha demostrado que la información obtenida de sus genes puede ser transferida y aplicada a otros microorganismos, a plantas

y a eucariotas superiores, lo que ha resultando en inusitados avances científicos y tecnológicos, especialmente al potenciar sus capacidades de resistencia y/o tolerancia a la sal. Es por eso que la expresión heteróloga de genes asociados con resistencia o tolerancia a la sal sigue siendo una de las metas mas importantes en la investigación sobre el estrés salino (Oren, 2003).

En lo que respecta al estrés salino, *S. cerevisiae* ha sido por mucho tiempo el modelo de levadura mas estudiado, a pesar de su baja tolerancia a la sal (Hohmann, 1997, 2002). Sin embargo, también se han realizado estudios en otras levaduras, donde particularmente destaca *D. hansenii* por su capacidad de tolerancia al estrés salino (Adler y Gustafsson, 1980; Adler *et al.*, 1985; Gustafsson y Larsson, 1987; André *et al.*, 1988; Burke y Jennings, 1990; Lucas *et al.*, 1990; Larsson *et al.*, 1990; Jovall *et al.*, 1990; Larsson y Gustafsson, 1993; Prista y Madeira-Lopes, 1995; Neves *et al.*, 1997; Prista *et al.*, 1997; Thomé-Ortiz *et al.*, 1998; Ramos, 1999; Thomé y Trench, 1999; Almagro *et al.*, 2000, 2001, Almagro y Ramos, 2003). El enorme interés que existe sobre este microorganismo, se basa en la necesidad de descubrir, obtener, comparar y aplicar mayores conocimientos sobre levaduras halotolerantes ya que ellas representan excelentes modelos para descifrar los mecanismos fisiológicos y moleculares que determinan la tolerancia extrema a la sal (Couto da Silva Graça, 2004).

### **5.3 Osmoregulación/osmoadaptación**

El mantenimiento de un balance hídrico dentro y fuera de la célula es fundamental para la supervivencia. Para mantener ese balance a veces se emplea el término

osmoregulación y a veces osmoadaptación. Algunos denominan la osmoregulación como la habilidad de las células de controlar activamente sus niveles de agua (Hohmann, 2007). Por su parte, osmoregulación apunta al “mantenimiento de la presión de turgencia y del volumen celular necesario para el crecimiento y la reproducción del organismo (Brown, 1990). Wood (1999) lo denominó como “ese proceso fisiológico que disminuye el impacto de ajustes en la estructura celular que han sido causados por cambios en la osmolaridad extracelular”. Según Hohmann (2002), la osmoadaptación es parte de la osmoregulación celular. Esta tiene un papel muy importante, pero poco conocido en el crecimiento celular y la morfogénesis. Se ha sugerido utilizar el término osmoadaptación mejor que osmoregulación ya que osmoregulación se refiere a una respuesta inmediata frente a la acción de un sensor o agente desencadenante mientras que osmoadaptación es un término más extenso (Mata, 2006), que describe tanto los cambios fisiológicos como los genéticos que se producen frente a la escasa actividad del agua (Galinski, 1995).

#### **5.4 Halotolerancia**

La halotolerancia es un concepto que se refiere a la adaptación de organismos a la salinidad. En 1998, Kushner y Kamekura propusieron las siguientes categorías microbianas de acuerdo a sus requerimientos de NaCl:

No halófilos: crecimiento óptimo a una concentración inferior al 1% p/v de NaCl.

Halófilos débiles: crecimiento óptimo es cerca del 3% p/v de NaCl.

Halófilos moderados: crecimiento óptimo entre 3-15% p/v de NaCl.

Halófilos extremos: crecimiento óptimo a 25% p/v de NaCl.

Según estas definiciones *D. hansenii* es considerada halófila moderada ya que su crecimiento óptimo es entre 3-5% de NaCl (Breuer y Harms, 2006).

## **5.5 Respuestas celulares en levaduras asociadas a la osmoadaptación**

### **5.5.1 Pared celular**

La pared celular de los hongos es una estructura con gran plasticidad, que da la forma a la célula, también controla la permeabilidad celular y protege a la célula de los cambios osmóticos (Slaninová *et al.*, 2000). La forma e integridad del hongo depende de la fortaleza de la pared celular (Gooday, 1995), y constituye el lugar de interacción con el medio externo, localizándose en ella las adhesinas y un gran número de receptores que tras su activación, desencadenarán una cascada compleja de señales en el interior (Pontón, 2008).

La pared celular está compuesta por polisacáridos como la quitina, quitosano, celulosa, 1,3- $\beta$ - y 1,6- $\beta$ -glucano y manoproteínas (Adams, 2004). Se han documentado esfuerzos para lograr entender la biosíntesis de los componentes de la pared celular. García *et al.* (2004), analizaron la respuesta genómica que afecta la integridad de la pared celular cuando se le aplican diferentes agentes químicos y físicos. En su estudio se encontró que la respuesta génica en cada caso involucraba más de 100 genes diferentes. Lesage *et al.* (2004), identificó 135 genes asociados a la síntesis y regulación del componente de la pared celular 1,3- $\beta$ -glucano. Durán y Nombela (2004), estimaron que el 20% del genoma de *Saccharomyces* está involucrado con la síntesis de la pared celular.

Hasta la fecha, casi todas las vías de señales de transducción descritas en levaduras actúan sobre el ensamblaje de la pared celular y destacan lo dinámico que es este componente celular en permitir la adaptación celular en respuesta a diferentes cambios ambientales (Castrejon *et al.*, 2007).

### **5.5.2 Membrana**

La membrana celular de las levaduras tiene como función principal controlar la permeabilidad celular y participar en la síntesis de la pared celular. Esta contiene fosfolípidos y esteroides como las células eucariotas superiores. Los esteroides, a diferencia de los mamíferos (en donde predomina el colesterol), son principalmente el ergo esterol y su precursor zosterol (Pesti y Novak, 1984). Estos compuestos son esenciales para la viabilidad de la membrana y se utilizan como órgano diana para el desarrollo de fármacos antifúngicos como los polienos.

En la membrana hay proteínas que regulan las vías de señalización que se activan como respuestas a cambios osmóticos y han sido identificadas y estudiadas a nivel molecular (Hohmann, 2002). Algunas han sido caracterizadas como sensores, localizadas en la membrana celular (Sln1p y Sho1p) e involucradas en la vía de señalización de alta osmolaridad de glicerol de "proteínas-cinasas mitogénicamente activadas" (MAPK). Se ha reportado que otras proteínas se extienden probablemente hasta la pared celular donde perciben cambios desde elasticidad en la pared hasta el monitoreo de hinchazón o encogimiento de la membrana plasmática (Hohmann, 2002). Se conocen también las proteínas GPI (glicofosfolípido) las cuales se han estudiado ampliamente en levaduras y

algunas de ellas están localizadas permanentemente en la membrana y tienen como función anclar proteínas hidrofílicas a la misma (Cabib *et al.*, 1998, Pitteta y Conzelmann, 2007). Toda la regulación coordinada de proteínas que ocurre a nivel de membrana celular es esencial para lograr homeostasis durante estrés salino (Bloomberg, 1995).

### **5.5.3 Ribosomas**

Las ribosomas son estructuras macromoleculares localizadas en el citoplasma para la síntesis de proteínas. Los ribosomas procarióticos y eucarióticos tienen una estructura y composición similar aunque el tamaño y el número de los componentes individuales varían. El tamaño de los ribosomas se expresa en términos de sus velocidades de sedimentación durante la centrifugación, en unidades denominadas Svedberg o S (Gardner *et al.*, 2007). Todas las proteínas ribosómicas en levaduras tienen un homólogo en mamíferos. En las levaduras los ribosomas consisten de una subunidad grande 60S y una pequeña 40S y cada uno contienen una copia de los cuatro ARN ribosomales (5S, 5.8S, 18S, y 25S) y 78 proteínas ribosómicas diferentes que son codificadas por 137 genes, 59 de los cuales están duplicados. La unidad 60S tiene 42 proteínas y tres moléculas de ARN y la unidad 40S tiene un solo gen de ARN ribosomal (18S) y 32 proteínas. La subunidad 40S traduce el ARN mensajero, leyendo el grupo de tres nucleótidos que corresponde para cada aminoácido. La otra subunidad (60S) está asociada a la formación de los enlaces peptídicos. Los ARN ribosómicos parecen tener la responsabilidad por la mayoría de las actividades enzimáticas y se ha sugerido que las



proteínas ribosómicas tienen funciones estructurales. Se ha reportado también que varias vías de señales de transducción pueden inducir o silenciar los genes ribosómicos lo cual puede implicar consecuencias mayores para la expresión de otros genes (Warner, 1999). Varios grupos de investigación han descrito la represión de síntesis de proteínas que ocurre después de un choque osmótico ya que durante el mismo las células tratan de reajustarse a los cambios en el ambiente (Bloomberg, 1995; Norbeck y Bloomberg, 1998; Rep *et al.*, 2000; Teige *et al.*, 2001). Teige *et al.* (2001), han llegado a proponer que la represión de síntesis de proteínas durante estrés osmótico no es causado por daño a la célula sino más bien por señales extracelulares mediadas por Hog1 y Rck2.

### **5.6 *Debaryomyces hansenii* - sistema modelo para estudiar halotolerancia**

*D. hansenii* es una levadura marina, perteneciente a la clase ascomicetos lo cual la aproxima evolutivamente a *S. cerevisiae* y a *Candida albicans* (Govind *et al.*, 1992). Es unicelular, uninucleada, haploide, fácil de mantener, almacenar y cultivar en el laboratorio: características que la hacen muy atractiva para su estudio. También ha sido aislada del salmón del atlántico, de embutidos, carne molida, (Dalton *et al.*, 1984), y quesos donde contribuye a su maduración debido a su capacidad para metabolizar ácido láctico y cítrico. Asimismo crece bien a pHs cercanos a la neutralidad o ligeramente básicos y tiene mucha más tolerancia a la sal (0-24%) que otras levaduras como *Pichia* y *Candida* (Adler, 1985; Norkrans, 1968). En los medios de laboratorio, *D. hansenii* crece perfectamente sin necesidad de añadir sal. Diferentes grupos de investigación han demostrado que niveles altos de sodio (del orden de 0,5 M NaCl) mejoran ligeramente pero significativamente la velocidad de crecimiento de la levadura (González-Hernández y

Peña, 2002). También se ha demostrado que la presencia de sodio en el medio protege a la levadura frente a factores adicionales de estrés abiótico como pH alcalino o a altas temperaturas (Prista *et al.*, 1997).

En procesos industriales *Debaryomyces* ha sido utilizada para la producción de xilitol, compuesto de amplia aplicación en la industria alimenticia debido a su poder edulcorante, sus propiedades anti-caries y por la tolerancia que presentan los diabéticos a este poliol (Cruz *et al.*, 2000). Se ha podido aislar y purificar la enzima Superóxido Dismutasa (Zn-SOD) de *D. hansenii* que tiene gran potencial biomédico en el tratamiento de un gran número de desórdenes patológicos de diferentes órganos como el hígado (Nikishimi y Machlin, 1975), la piel (Chedekel *et al.*, 1978), los ojos (Bunce, 1994) y el cerebro (Rothstein *et al.*, 1994). Así mismo, se ha estudiado el potencial de esta levadura como herramienta biológica para el tratamiento de contaminantes (Gadd y Edwards, 1986). En *D. hansenii* se ha observado que la síntesis de riboflavina (vitamina B2) aumenta en presencia de metales pesados como cobalto (Seda *et al.*, 2007), cobre, zinc y hierro, detectándose ésta por su color amarillo intenso. La utilización de este proceso biológico puede ser muy útil en la detección de contaminación por estos metales pesados en ambientes terrestres y marinos. Otra aplicación ambiental estudiada en este organismo ha sido su capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos carcinogénicos tales como el Naftaleno, Bifenol y Bencepireno (Cerniglia y Crow, 1981).

### **5.7 *Debaryomyces hansenii* - sistema modelo para estudiar osmoregulacion**

*D. hansenii* ha sido caracterizada como una de las levaduras más tolerantes a sal aisladas de ecosistemas marinos (Norkrans, 1966; Norkrans y Kylin, 1969) pero también tiene la gran ventaja que puede crecer en ausencia de ésta. En este momento uno de los mayores retos científicos se relaciona a los mecanismos moleculares involucrados a tolerancia de microorganismos a altas concentraciones de sal. Aunque la fisiología y bioquímica de la tolerancia a la sal se han estudiado intensivamente en esta levadura, (Blomberg y Adler, 1992), se conocen muy pocos genes relacionados a la osmotolerancia y muchos menos han sido aislados.

### **5.7.1 Mecanismos de osmotolerancia en *D. hansenii***

#### **5.7.1.1 Solutos compatibles: glicerol, arabitol y trealosa**

La acumulación de solutos para disminuir el potencial del agua intracelular es una de las estrategias empleadas por todo tipo de células (Rep *et al.*, 2000). Adler y Gustafsson (1980) encontraron que *D. hansenii* responde a altas concentraciones de sal produciendo glicerol en la fase logarítmica y arabitol en la fase estacionaria de crecimiento. La cantidad de glicerol que se acumula es directamente proporcional a la salinidad del ambiente. Esto refleja que *D. hansenii* tiene la capacidad de percibir diferencias en salinidad y producir una adecuada concentración de glicerol (Adler, 1986) sugiriendo que el glicerol actúa como un agente osmoprotector (Gustafsson y Norkrans, 1976, 1990; Thomé y Trench, 1999; Guerrero *et al.*, 2005, Thomé, 2005). Se ha reportado también que *Debaryomyces* utiliza la trealosa como soluto compatible y que produce mas trealosa que la misma *S. cerevisiae* (González-Hernández *et al.*, 2005). El mismo grupo

(González-Hernández *et al.*, 2005) reportó que cuando *D. hansenii* se encuentra bajo estrés salino (2-3M) acumula mas glicerol que trealosa mientras que lo opuesto es cierto bajo condiciones de estrés salino moderado. Eso sugiere que trealosa pueda estar actuando como una fuente de carbohidrato como lo hace en plantas, bacterias y otros microorganismos (Wingler A, 2002; González-Hernández *et al.*, 2005; Breuer y Harms, 2006).

#### **5.7.1.2. Rutas metabólicas involucradas en respuesta al estrés salino**

Se ha demostrado que los cambios de osmolaridad del entorno afectan diferentes vías de señalización. La ruta metabólica que permite que la sal se pueda utilizar como activador en *D. hansenii* para la producción de compuestos, se conforma de un grupo de proteínas conocidas como proteínas cinasas (MAPK -mitogen activated protein kinases) (Brewster *et al.*, 1993). Las MAP cinasas son unidades de señalización, que en apariencia, se encuentran altamente conservadas en los sistemas eucariotas y que juegan un papel esencial en la respuesta a los cambios del ambiente, hormonas, factores de crecimiento y citosinas. Muchas especies eucarióticas, emplean la vía de las MAP cinasas para este propósito (Rep *et al.*, 2000), las cuales controlan el crecimiento celular, morfogénesis, proliferación y respuestas al estrés y están involucradas en muchos procesos en algunas enfermedades (González Hernández y Peña, 2002) especialmente en el cáncer.

En *Saccharomyces* hay por lo menos cuatro vías diferentes de MAP cinasas que controlan la respuesta de feromonas, filamentación, integridad de la célula, y crecimiento en alta osmolaridad. Existen tres clases de proteínas cinasas: la MAP cinasa (MAPK), la MAP cinasa, cinasa (MAPKK o MEK) y la MAP cinasa, cinasa, cinasa (MAPKKK o MEKK). Estas actúan en serie donde la proteína MAPKKK activa por fosforilación a la MAPKK sobre una serina y una treonina en una parte conservada del dominio N-terminal de la cinasa. Subsecuentemente, la MAPKK fosforila la MAPK sobre una treonina (Gustin *et al.*, 1998; Posas y Saito, 1997; Herskowitz, 1995).

Por su parte la vía de alta osmolaridad por glicerol (HOG-high osmolarity glycerol) que mejor se conoce en levaduras corresponde a *S. cerevisiae*. Esta se activa en menos de un minuto cuando ocurre un cambio de osmolaridad (Gustin *et al.*, 1998). En términos generales la vía HOG consiste de tres MAPKKKS (Ssk2p, Ssk22p y STE11p) que activan una MAPKK (Pbs2p), que a su vez activa a MAPK (Hog1p) (Gustin *et al.*, 1998). La incapacidad de mutantes de HOG para adaptarse a un medio de alta osmolaridad confirma que esta vía es dirigida en parte por la respuesta transcripcional de las células de levaduras hacia una alta osmolaridad. Genes homólogos a HOG1 (Bansal y Mondal, 2000) y PBS2 (Bansal *et al.*, 2001), fueron aislados en *D. hansenii* por complementación fenotípica en *S. cerevisiae*. De igual manera, un gen homólogo a GPD1 fue también aislado en *D. hansenii* utilizando la misma técnica (Thomé, 2004). Sin embargo la función de estos genes en *D. hansenii* no ha sido elucidada por falta de mutantes.

### **5.7.1.3. Transporte de iones en condiciones de estrés salino**

Por lo general, los iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  son muy importantes en los mecanismos involucrados en el mantenimiento del balance osmótico celular. Los mecanismos de halotolerancia en *D. hansenii*, a diferencia de *S. cerevisiae*, incluyen la acumulación de altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Esto sugiere que la haloadaptación no tiene que ver con la capacidad de extraer iones de  $\text{Na}^+$ , como lo habían asumido Norkrans y colaboradores (1969), pero sí con una resistencia intrínseca a los efectos de toxicidad del mismo (Prista *et al.*, 1997).

### **5.7.1.4. Rol de las ATPasas en el transporte de iones en condiciones de estrés salino**

Las ATPasas son complejos de enzimas transportadoras de iones adheridos a la membrana celular. Estos complejos combinan la síntesis y/o hidrólisis de ATP con el transporte de protones a través de la membrana. Las ATPasas pueden aprovechar la energía de un gradiente de protones para dirigir la síntesis de ATP utilizando el flujo de iones por el canal de protones a través de la membrana. Otras ATPasas trabajan en sentido inverso, utilizando la energía que genera la hidrólisis de ATP para crear entonces un gradiente de protones. Existen diferentes tipos de ATPasas, clasificadas de acuerdo a su función (síntesis y/o hidrólisis de ATP), a su estructura (ATPasas F, V, A ó P) y al tipo de iones que transportan. Las F-ATPasas se encuentran en mitocondrias, cloroplastos y membranas plasmáticas de bacterias (Morsomme *et al.*, 2000), las V-ATPasas se encuentran primordialmente en vacuolas eucariotas (Garrett-Engele *et al.*, 1995), las A-ATPasas se encuentran en Archaeas, las E-ATPasas son enzimas de la superficie celular

y las P-ATPasas se encuentran en bacteria y en membranas plasmáticas eucariotas (Marquez y Serrano, 1996).

Se ha propuesto un mecanismo en *D. hansenii* para el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  donde una ATPasa energiza la membrana plasmática y por la salida masiva de protones se genera un potencial transmembranal y un gradiente de pH (Serrano, 1980; Thomé *et al.*, 1998; Prista *et al.*, 1997). El potencial de la membrana se cree que lleva a la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de uno de los canales. El  $\text{Na}^+$  entonces puede ser expulsado lentamente por otra ATPasa-tipo P codificada por el gen de ENA1. Estos genes de ENA1 y ENA2 en *D. hansenii* son similares a los mismos genes en *S. cerevisiae* y parecen que están involucrados en la expulsión de  $\text{Na}^+$ . El gen DhENA1 se expresa en la presencia de altas concentraciones de  $\text{Na}^+$ , mientras que el DhENA2 requiere también valores altos de pH (Almagro *et al.*, 2001). Almagro y colaboradores también sugieren que las proteínas codificadas por los genes ENA en *D. hansenii* tienen un rol importante en mantener en balance los niveles de cationes intracelulares y la homeostasis iónica en la célula.

## **5.8 El análisis funcional del genoma de la levadura provee nuevas herramientas para el estudio de la genómica.**

### **5.8.1 El genoma nuclear de *S. cerevisiae***

La levadura *S. cerevisiae* posee un genoma pequeño, solamente una cuantas veces mayor que el de *Escherichia coli* y 200 veces menor que el de células de mamífero, esto simplifica de manera importante el análisis genético y molecular del mismo. *S. cerevisiae* es una levadura haploide que contiene 16 cromosomas variando en tamaño de 200 a 2200

kb, en los cuales como resultado del análisis de la secuencia del genoma, se localizaron un total de 6183 marcos de lectura abiertos y se predijo que de éstos, 5800 correspondían a genes que codificaban para proteínas. A diferencia de los genomas de organismos multicelulares, el genoma de la levadura es muy compacto, dado que el 72% de la secuencia corresponde a secuencias codificantes (Mewes *et al.*, 1997).

### **5.8.2 El genoma de *D. hansenii***

La secuenciación del genoma de la cepa *D. hansenii var hansenii* CBS767 (Dujon *et al.*, 2004), reveló que el genoma se compone de siete cromosomas cuyo tamaños están entre 1.25 Mb a 2.33 Mb para un total de 12.2 Mb sin incluir el ADN ribosómico. El proyecto Génolevures (Lepingle *et al.*, 2000), una investigación comparativa de genomas de la clase hemiascomicetos, ha reportado que *D.hansenii* parece tener la capacidad codificante mas alta entre las levaduras estudiadas en este proyecto, y eso equivale a un 79.2% del genoma, con 6906 secuencias codificantes que han sido detectadas. Este organismo es también la levadura que posee el genoma mas redundante, con una redundancia de 49.2% comparado con un 40% en *S. cerevisiae* (Llorente *et al.*, 2000). La flexibilidad que presenta *D. hansenii* en sus características genéticas podrían ser beneficiosas en aplicaciones biotecnológicas sin embargo no se puede evitar que su complejidad pueda complicar el control de estas mismas aplicaciones (Breuer y Harms, 2006).



## **5.9 Abordaje genético-visión panorámica del genoma con los microarreglos**

### **5.9.1 Antecedentes históricos**

La biología molecular ha tenido a su disposición múltiples técnicas para medir los niveles de ARN, ADN, proteínas o metabolitos como lo son: “Northern Blots”, “SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)” y Southern Blots, entre otros. Lo revolucionario de la era post genómica no es lo que se puede medir sino la cantidad de mediciones simultaneas que se pueden realizar especialmente con la nueva tecnología de los microarreglos. Los microarreglos empezaron a ser una realidad al principio de los años ochenta, y fueron operativos, por vez primera, en la década de los noventa, gracias a los trabajos de Southern, Fodor-Stryes; Mirzabekov o Brown, y al esfuerzo de empresas como Affymetrix e Incyte-Stanford University. El microarreglo es un sustrato sólido (cristal, plástico, sílice) en el cual las secuencias de miles de genes (sondas) pueden ser fijadas o inmovilizadas en un orden específico y en un lugar específico. El ADN o ARN es impreso o sintetizado directamente en el sustrato sólido, normalmente en una laminilla de cristal. Esta laminilla será expuesta a moléculas diana. El proceso completo esta basado en el nivel de hibridación entre la sonda específica y la molécula diana que ha sido marcada con colorantes fluorescentes. Se mide la intensidad de fluorescencia. Esta determinará el grado de expresión de cada gen. Los experimentos de microarreglos generan cantidades inmensas de datos que deben ser almacenados, procesados y analizados. Se necesita un programa estadístico para el análisis de datos, específico para microarreglos. Hay muchas opciones en el mercado y entre las más reconocidas están:

Bioconductor, GeneSpring (Agilent) y BRB Array Tools (Biometric Research Branch of the Division of Cancer Treatment & Diagnosis of the National Cancer Institute ).

Es importante y es requisito de casi todas las revistas científicas depositar todos los datos obtenidos de un microarreglo en un banco de datos que sea específico para microarreglos. Existen varias opciones, entre ellas:

MIAME	Minimum information about a Microarray Experiment
GEO	Gene expression data repository and online resource
yMGV	Public queries of yeast data
ArrayExpress	Public data deposition and public queries
SMD	The Stanford Microarray Database

### **5.9.2 Respuesta transcripcional en levaduras al estrés salino**

En *S. cerevisiae* se ha analizado la respuesta transcripcional al estrés osmótico, donde por un lado, un grupo de 186 genes involucrados en el metabolismo de glicerol, trehalosa, glucógeno, azúcares, aminoácidos, reacciones de reducción-oxidación, función mitocondrial y de protección celular, aumentó al menos tres veces su nivel basal del ARNm. Mientras que otro grupo constituido por 100 genes disminuyó su actividad (Rep *et al.*, 2000). Existen otros estudios de estrés osmóticos en *S. cerevisiae* que también han utilizado microarreglos y estos serán comentados en la parte de la discusión de los resultados obtenidos con *D. hansenii*.

Innumerables veces se ha reportado las dificultades para definir las bases fisiológicas y moleculares de la alta tolerancia a la sal que posee *D. hansenii*. A la fecha, se ha publicado un solo reporte sobre el uso de microarreglos en *D. hansenii*, pero relacionado a la industria de procesamiento de alimentos, específicamente en procesos de maduración de quesos. Estos microarreglos consistieron en el estudio de 86 genes de tres levaduras: *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, y *Yarrowia lipolytica* para determinar la expresión de genes en un medio de cultivo parecido al ambiente de maduración de quesos. Tales genes fueron seleccionados por su asociación a los procesos de catabolismo de lactosa y la biosíntesis de compuestos de sulfuro (Cholet O *et al.*, 2007). Otros estudios han incluido microarreglos heterólogos utilizando el genoma de *S. cerevisiae* para el diseño, y los han hibridizado con el ADN complementario de células de *D. hansenii* (Castro *et al.*, 2006; Garcia Salcedo *et al.*, 2006). Nuestra investigación utilizando microarreglos es la primera de su clase, donde se obtiene el perfil de la respuesta transcripcional a estrés osmótico del genoma completo de *D. hansenii* CBS767, que incluye 6,320 genes, los cuales se estudian antes y después del tratamiento de las células con NaCl 2M.

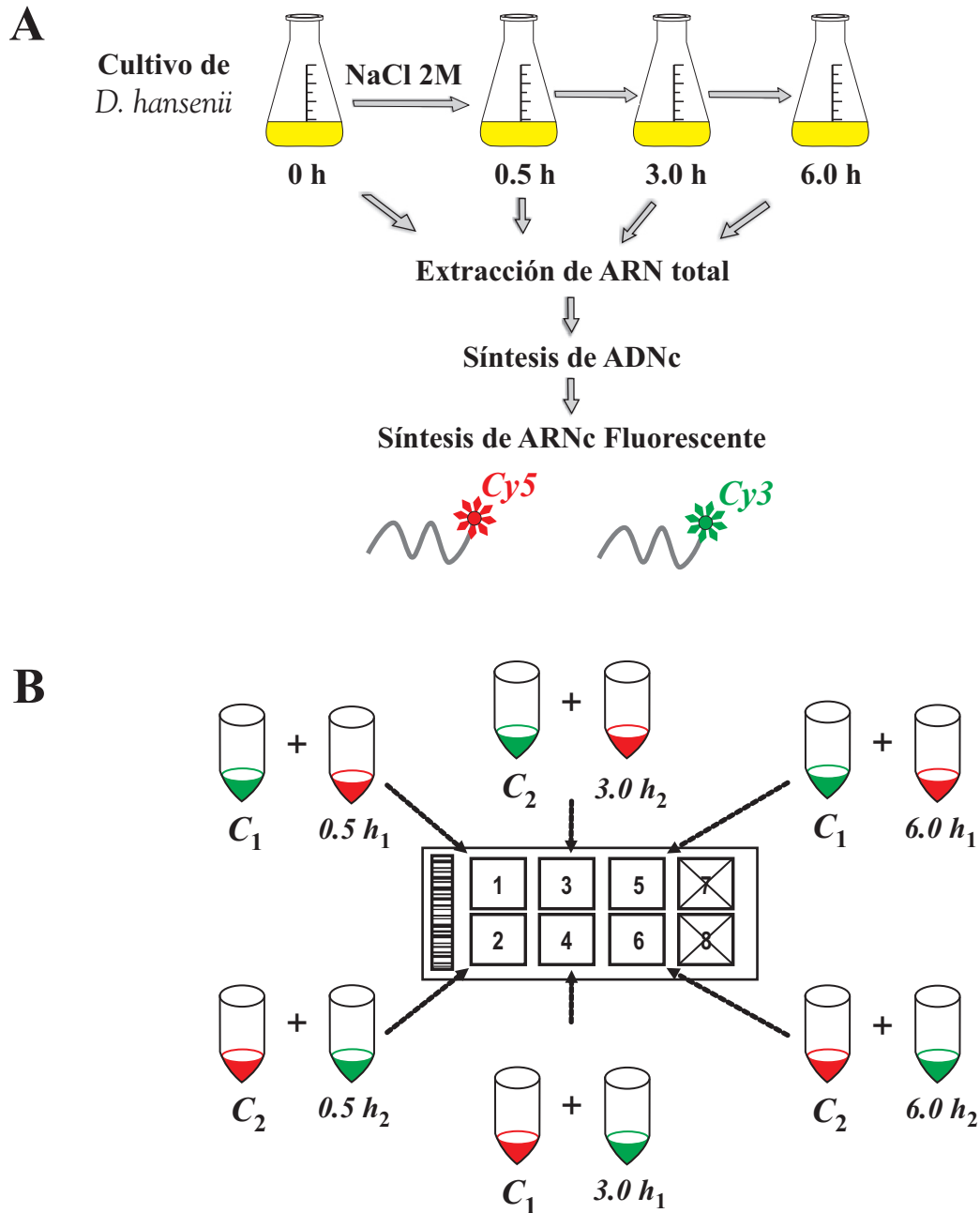
## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Cepas de levaduras y condiciones de crecimiento

La cepa utilizada fue *D. hansenii* CBS767 que se obtuvo de la Collection de Levures d'Intérêt Biotechnologique (Thiverval-Grignon, France). La levadura se cultivó en lote en medio YPD (Extracto de levadura 1%, Peptona 2%, Glucosa 2%) hasta la fase logarítmica temprana ( $ABS_{600nm}$  8.0-9.0) a 30° C en agitación rotatoria a 200-250 rpm. Se colectó una alícuota de las células al tiempo 0 h, la que se congeló a -80° C hasta la preparación de ARN. Los experimentos de inducción de estrés osmótico se realizaron mediante la adición de NaCl a una concentración final de 2M en el medio de cultivo después de lo cual se obtuvo muestras a los 30 min, 3 h y 6 h. Las células se colectaron por centrifugación durante 5 min a 5000 rpm y se congelaron a -80° C (Figura 3).

### 6.2 Diseño de sondas y de microarreglos de expresión génica

Las secuencias de ARNm del genoma completo de *D. hansenii* se descargaron en formato FASTA desde el GenBank y se guardaron en formato de texto. Las secuencias en formato de texto se cargaron en la página de eArray de Agilent Technologies (Santa Clara, CA) para el diseño de las sondas. Se diseñaron dos sondas por secuencia blanco en



**Figura 1.- Diseño experimental usado para el análisis del perfil de expresión del genoma completo de *D. hanseni* en los ensayos con microarreglos.** A) Los cultivos de la levadura se hicieron crecer en medio YPD en ausencia (células control) o presencia de NaCl 2M. Se obtuvo el ARN total a partir de las muestras control (0 h) y alícuotas de muestras experimentales colectadas a a las 0.5, 3 y 6 horas después de la exposición a la sal. A continuación, se marcó el ARNc mediante fluorescencia usando los colorantes Cy-3 o Cy-5. B) La inversión de fluorocromos se realizó usando diferentes replicas tanto para las unidades control marcadas con Cy-5 como para las experimentales marcadas con Cy-3. Las unidades de ARNc combinadas con Cy-3 y Cy-5 se utilizaron para la hibridación de sondas en la rejilla de microarreglos de 8,000 x 15,000 diseñada para secuencias del genoma completo de *D. hanseni*.

la orientación con sentido, utilizando la metodología recomendada por Agilent para microarreglos de expresión. Las sondas se alinearon con BLAST a otras secuencias de levaduras, utilizando genómica comparativa, y se clasificaron de acuerdo a sus similitudes: altamente similar, similar, alguna similitud, débilmente similar y ninguna similitud, en base a la homología de las secuencias.

Las sondas fueron evaluadas de acuerdo a su especificidad, posibilidad de reacción cruzada y complementariedad entre si mismas. Las mejores sondas se utilizaron para generar un microarreglo en un formato de 8 x 15K. Cada microarreglo tuvo una capacidad de 12,640 sondas (6,320 genes, cada gen con dos sondas) de 60 pb de longitud, 459 controles positivos (con concentraciones conocidas de secuencia blanco) y 77 controles negativos distribuidos por todo el microarreglo. Los controles positivos se utilizaron como control de calidad para los pasos de la síntesis de ARNc, el marcaje e hibridación, mientras que los controles negativos se incluyeron para poder estimar tanto la fluorescencia de fondo así como la variabilidad.

### **6.3 Extracción de ARN Total**

El ARN total se aisló como es descrito en el protocolo del RNeasy™ Mini Kit de QIAGEN (California). La concentración y la integridad del ARN de las muestras se verificó utilizando el Agilent's 2100 Bioanalyzer y el RNA 6000 Nano LabChip®. Se requirió una concentración de 50 ng - 5ug/ul. La pureza de la muestra se determinó con la relación de las lecturas de  $A_{260}/A_{280}$ , en la cual se espera una relación de 1.9-2.0. Las lecturas se confirmaron utilizando el Espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop

Technologies, Rockland, DE). Este ARN se usó para generar el ADNc y a partir de éste se generó el ARNc.

#### **6.4 Síntesis y purificación de ARNc fluorescente**

El ARNc de las muestras del control y las experimentales se amplificó y marcó como es descrito en el protocolo “Agilent Low RNA Input Linear Amplification Kit” (Agilent Technologies) utilizando dos colorantes fluorescentes: cianina 3-CTP (Cy3) y cianina 5-CTP (Cy-5, Amersham). Brevemente, se generó ADNc de doble hebra utilizando la transcriptasa en reversa del virus de la Leucemia Murina de Moloney (MMLV-RT). En la primera reacción, 1 µg de ARN total se mezcló con los iniciadores que son complementarios a los promotores T7 y la mezcla diluida del “Spike-in Mix” (A o B), se incubó por 10 min a 65°C y posteriormente en hielo por 5 min. Los iniciadores desnaturalizados y el ARN total se mezcló con los siguientes reactivos (cDNA Master Mix-Agilent Technologies): 5 X First Strand Buffer, 0.1 M DTT, 10 mM dNTP, MMLV-RT, y RNaseOUT. Esta reacción se incubó a 40°C por 2 h, luego a 65°C por 15 min, y finalmente en hielo por 5 min. La síntesis y marcaje del ARNc se realizó simultáneamente al mezclar la reacción conteniendo el ADNc de doble hebra con un “transcription Master Mix”: (4 X Transcription Buffer, 0.1 M DTT, mezcla de dNTPs mix, 50% PEG, RNaseOUT, inorganic pyrophosphatase, T7 RNA polymerase, Cy-3 or Cy-5 (10 mM, cada uno) y agua libre de nucleasas y rnasas , para un volumen total de 60 µl). La reacción se incubó por 2 h a 40°C.

Las sondas fluorescentes de ARNc amplificadas se purificaron con las columnas de Qiagen “RNeasy-mini spin”. Una vez purificadas estas muestras se analizaron con el espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop 3 Technologies, Rockland, DE) para determinar concentración e incorporación del colorante utilizado. El próximo paso de hibridación se realizó con solo aquellas muestras de una concentración de más de 8 pmol/mg (una cantidad que representa una incorporación eficiente del colorante).

### **6.5 Protocolo de hibridación y lavado**

El diseño experimental consistió de 6 microarreglos. Las muestras de control del ARNc marcado con Cy-3 se combinó con muestras experimentales de ARNc marcadas con el Cy-5 obtenidas a las 0.5 h, 3 h y 6 h. Las muestras combinadas se utilizaron para la hibridación con las sondas en el primer, tercer y quinto microarreglo respectivamente. El colorante se alternó utilizando diferentes replicas biológicas tanto para las muestras control como las experimentales utilizadas para hibridación en el segundo, cuarto y sexto microarreglo. El alternar los colorantes con las diferentes replicas biológicas se hizo para corregir cualquier tendencia de los colorantes. El protocolo de hibridación y lavados se hizo según lo recomendado por Agilent Technologies (Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol, Versión 5.5, February 2007). Brevemente, 300 ng de ARNc marcado con Cy-3 y Cy-5 se mezclaron con Amortiguador 10X para bloqueo (Blocking Agent) y Amortiguador de Fragmentación 25X, la mezcla fue incubada a 60°C por 30 min. La reacción se detuvo con Amortiguador de Hibridación GE (Gene Expresión) 2X HI-RPM y se hibridó con el microarreglo por 17 horas a 60°C con



rotación continua (10 rpm). Los reactivos utilizados en este paso son del “Gene Expression Hybridization Kit” (Agilent Technologies). Después de hibridar, las laminillas se lavaron por 1 min a Temperatura Ambiente con la solución de lavado GE #1 y por un minuto a 37°C con la solución de lavado GE #2. Luego se lavaron las laminillas por 1 min con acetonitrilo (Sigma). Se realizó un lavado final del microarreglo por 30 seg con la solución Estabilizadora y posteriormente éste fue secado.

## **6.6 Procesamiento de datos y análisis estadísticos**

Luego de la hibridación de los experimentos de microarreglos el paso siguiente consistió en obtener una imagen digital que representó las intensidades de expresión de cada uno de los puntos (spots, manchas). Las imágenes de los microarreglos fueron obtenidas utilizando el escáner para microarreglos y el software (v8.1) de extracción de intensidad, ambos de Agilent. Brevemente, los parámetros de resolución para escanear fueron de 5  $\mu\text{m}$  utilizando el mínimo (10%) y el máximo (100%) de la sensibilidad de detección del tubo fotomultiplicador (PMT, photomultiplier tube). Se realizó una evaluación inicial del microarreglo utilizando la información proveniente del reporte de calidad que a su vez provino del software de extracción de intensidad de Agilent. Posteriormente se verificó la uniformidad y reproducibilidad de los microarreglos y las curvas de los controles positivos (spike-ins) y se confirmó que no hubo errores durante el procedimiento de los microarreglos. Se calcularon los valores de la intensidad promedio de cada dos sondas/gen para cada uno de los microarreglos.

Hay muchas fuentes de variación sistemática en experimentos de microarreglos, ellos pueden afectar las mediciones de los niveles de expresión genética. Una vez obtenida la matriz de datos de la imagen escaneada, en el próximo paso se aplicó técnicas de pre-procesamiento para eliminar o substituir valores perdidos así como identificar datos fuera de rango y normalizar los datos. Normalización es el término usado para describir el proceso de remover tal variación. Es tratar de remover el impacto del efecto de la tecnología de microarreglo en los datos que se obtienen del proceso (Acuña, 2003).

Nuestro análisis de datos de los microarreglos consistió en :

- a) normalización para cada microarreglo y entre los microarreglos,
- b) ajustar los datos a un modelo lineal
- c) calcular la expresión significativa de cada gen

La normalización de los datos se realizó por el método descrito por Smyth y Speed (2003). Brevemente, para cada microarreglo los valores M se normalizaron por separado usando la función Loess sin corrección de fondo. Por su parte, la normalización de las intensidades de expresión entre microarreglos, se realizó usando el método Aquantile. La mayoría de los métodos de normalización hacen uso de la siguiente suposición: El promedio de la razón Cy5/Cy3 es 1 o equivalentemente, el promedio del logaritmo de las razones es 0. Es decir, que el gen promedio no cambia su expresión bajo la condición que está siendo estudiada. Esto es debido a que solo entre el 10 y 20% de los genes son expresados al mismo tiempo. En un gráfico de Cy5 *versus* Cy3 los puntos deben estar alrededor de una línea con pendiente 1. También se pueden hacer gráficas MA (M es por “minus” y A es por “Add”) que describen la razón log de Red (Cy5-Rojo) *versus* Green

(Cy3-Verde). El valor M en el eje de y *versus* el valor A en el eje de x. El valor  $M = \log_2(R) - \log_2(G)$ , y el valor A, describiendo la intensidad de cada spot, donde  $A = (\log_2(R) + \log_2(G))/2$ .

Los datos de nuestros experimentos fueron ajustados a un modelo lineal. En este experimento las fuentes de ARN se identificaron como provenientes de diferentes tiempos (0 h, 30 min, 3 h y 6 h) después de la exposición a la sal (NaCl 2M). El alternar los colorantes Cy3 y Cy5 se realizó para así corregir las posibles diferencias de incorporación de los mismos. La comparación principal se hizo entre cada tiempo y la muestra control (el tiempo 0 h antes de exponer el organismo a la sal). El modelo lineal calculó un coeficiente de expresión correspondiente a los  $\log_2$  de las varias comparaciones realizadas.

Finalmente, para encontrar los genes con cambios significativos en sus niveles de expresión se utilizó las estadísticas empíricas de Bayes (eBayes) según descrito por Smith *et al* (2006). A los valores p calculados por eBayes se les realizó múltiples correcciones para así ajustarlos al “promedio de descubrimientos falsos” (false discovery rate) a  $p < 0.05$ , usando estadísticas anidadas F de Benjamín y Hochberg’s. Los genes significativos se categorizaron de acuerdo al factor logarítmico de probabilidades (Factor de Bayes), esto es, la probabilidad que tiene un gen de expresarse diferencialmente. Todos estos procedimientos descritos anteriormente se realizaron con el programa LIMMA de Bioconductor (Smyth, 2005). La anotación para cada gen significativo se obtuvo del banco de datos –GenBank- para *Debaryomyces hansenii* CBS 767. Se agruparon aquellos

genes significativos que mostraron patrones de expresión parecidos utilizando el coeficiente de expresión obtenido del análisis estadístico eBayes y fueron exportados al software Sigma Plot para un análisis gráfico.

Todos los datos de los microarreglos que hemos descrito en este trabajo han seguido las recomendaciones del proyecto MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment) y han sido depositadas en el banco de datos de expresión génica NCBI y en base de datos públicos para microarreglos GEO (Gene Expression Data Repository and Online Resource) con el número de acceso GSE9911.

### **6.7 Diseño de iniciadores para PCR en Tiempo Real**

Se obtuvieron las secuencias de los genes de interés, ENA1, HWP1 y ACT1 del banco de datos GenBank (ENA1, número de acceso XM\_457790, HWP1, número de acceso XM\_462314 y ACT1 (*actin*, utilizado como un gen control o de referencia) número de acceso XM\_45873). El programa o software NetPrimer fue utilizado para diseñar los iniciadores y así evitar la formación de estructuras como dímeros de iniciadores, horquillas, dímeros con otros iniciadores con energía de enlace alta. Una búsqueda en BLAST de las secuencias escogidas como iniciadores fue necesaria para asegurar que no pudieran aparearse (apareamiento de bases del ADN) (“anneal”) a otras muestras.

Se utilizaron los siguientes iniciadores sentido y antisentido:

ENA1SENTIDO      5'-ATGGTGTGCGTTATTATTAG-3'(T<sub>m</sub>=52.0°C)

ENA1ANTISENTIDO 5'-CATTGTGTTTCGATTTCG- 3'      (T<sub>m</sub>=50.5°C)

HWP1SENTIDO 5'-GCCGGTACCACTCCAG-3' (Tm=54.7°C)

HWP1ANTISENTIDO 5'-AGAAGTAGATTGAGCAGCA-3' (Tm=51.2°C)

ACT1 SENTIDO 5'-GATTATGAAGTGTGATGTC-3' (Tm = 52.4°C)

ACT1ANTISENTIDO, 5'-TTAGAAACACTTATGATGAAC-3'(Tm=55.37°C)

Todos los iniciadores fueron sintetizados y purificados por HPLC en GENOMECHANIX (Gainesville, FL).

## 6.8 Experimentos de PCR en Tiempo Real

Estos ensayos fueron realizados para los genes ENA1 y HWP1 como es descrito en la guía de aplicación “Methods and Application Guide ©2006, Stratagene.” usando “Brilliant® II QRT-PCR 1-Step Master Mix (Cat. Nos. 600809)” y el analizador “Mx3005P” ambos de Stratagene (La Jolla, CA). Las reacciones experimentales fueron preparadas en un volumen final de 25  $\mu$ l combinando 7.06  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas grado PCR; 12.5  $\mu$ l de Mezcla maestra 2XQRT-PCR; 87.5 pmol/ $\mu$ l de iniciador sentido; 72.05 pmol/ $\mu$ l de iniciador antisentido (concentración optimizada para ENA1); 0.375  $\mu$ l de colorante fluorescente de referencia; y 0.0625  $\mu$ l de la mezcla de la enzima “StrataScript RT/RNase”. Las reacciones fueron mezcladas evitando formar burbujas y fueron distribuidas en la placa con 96 pozos diseñada para este analizador. 100 ng de ARN fue añadido a cada reacción y mezclada cuidadosamente. Las reacciones fueron colocadas en el analizador Mx3005P y sometidas al siguiente programa de corrida de RT-PCR: 1 ciclo por 30 min a 50°C, 1 ciclo por 10 min a 95°C y 40 ciclos de los siguientes pasos, 30 segundos a 95°C, 60 seg a 50°C para ENA1 (53°C para HWP1) y 30 seg a 72°C.

El mismo protocolo fue usado para HWP1 y ACT1 excepto las concentraciones de iniciadores, las cuales fueron las siguientes, para HWP1: 56.88 pmol/ $\mu$ l de iniciador sentido, 59.89 pmol/ $\mu$ l de iniciador antisentido. Para ACT1: 31.5 pmol/ $\mu$ l de iniciador sentido, 21.4 pmol/ $\mu$ l de iniciador antisentido.

Curvas estándar fueron generadas para cada uno de los genes de interés y para el gen referencia. Las curvas se prepararon de las diluciones seriadas del gen de referencia y de las diluciones seriadas de ARN total (25 -100 ng). Las reacciones qRT-PCR fueron preparadas como descritas anteriormente en esta sección utilizando los mismos reactivos y protocolo sugerido por Stratagene-Agilent Technologies. Un control sin secuencia blanco fue incluido con todas las reacciones para determinar la presencia de artefactos como por ejemplo dímeros de iniciadores, productos de amplificación inespecíficos. Adicionalmente fue incluido un control no tratado con RT para detectar el potencial de productos amplificados generados a partir de ADN genómico. Se realizaron análisis de curvas de disociación para identificar productos secundarios potenciales en las reacciones de amplificación. Finalmente los productos de amplificación fueron verificados en geles de agarosa. La abundancia de cada gen fue determinada usando el método  $\Delta\Delta$ Ct. El método delta-delta Ct expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control tal y como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{Razón (ratio)} = 2^{-[\Delta\text{Ct muestra} - \Delta\text{Ct control}]}$$

$$\text{Razón} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Los valores umbral de ciclo o Ct, por sus siglas en ingles, “threshold cycle”, ) fueron determinados por la identificación del ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se elevó por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción del PCR.

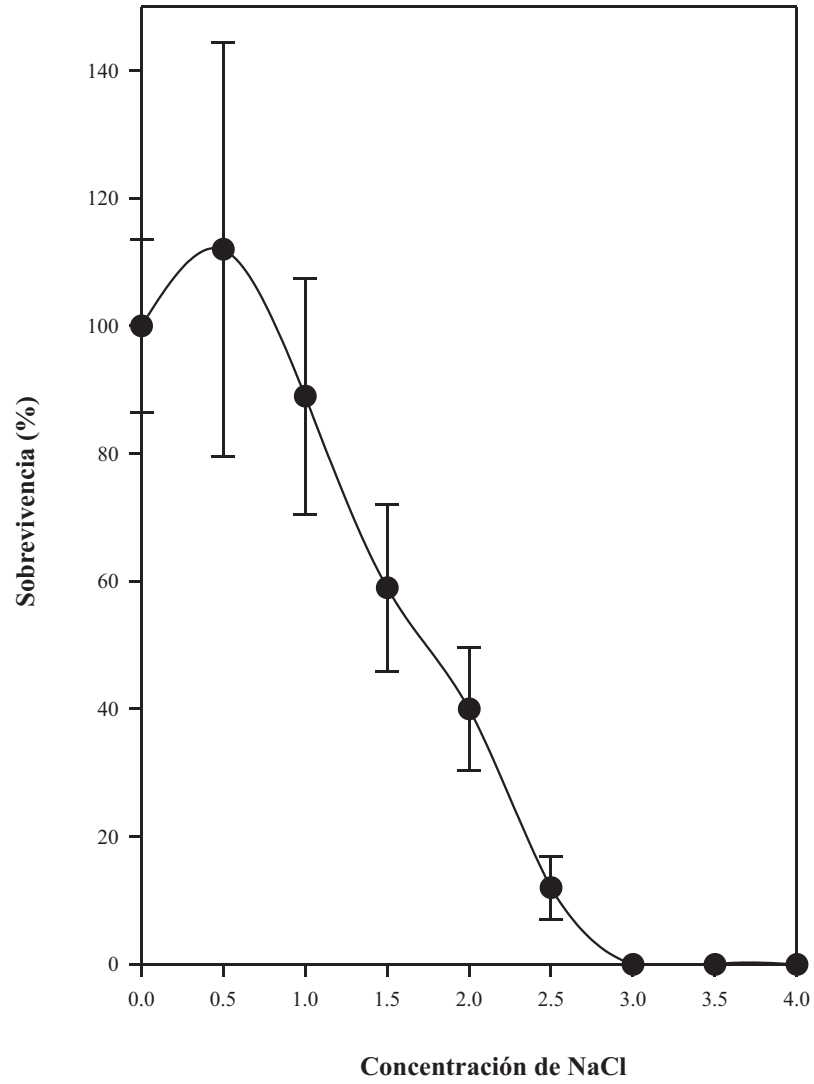
Para los estudios de validación, se usaron tres replicados biológicos (no los usados previamente en los estudios de microarreglos), cada corrida en triplicado. El cálculo de la varianza unidireccional (ANOVA) de los valores relativos de expresión genética obtenidos de la validación de los estudios de Tiempo Real fué realizado con el software SigmaPlot.

## 7. RESULTADOS

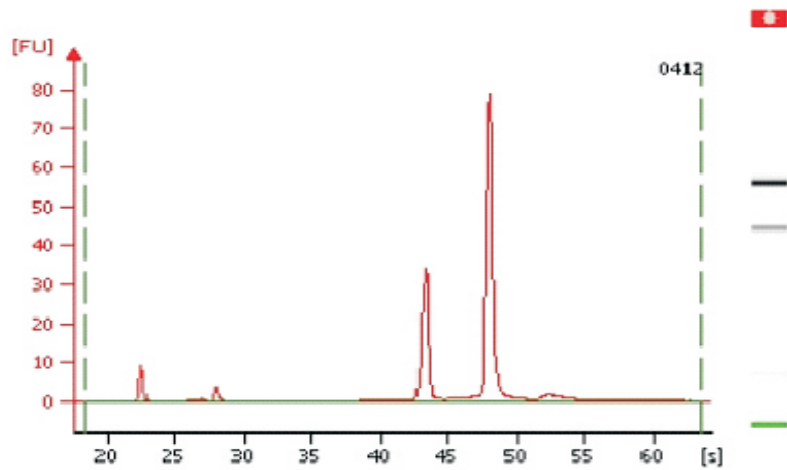
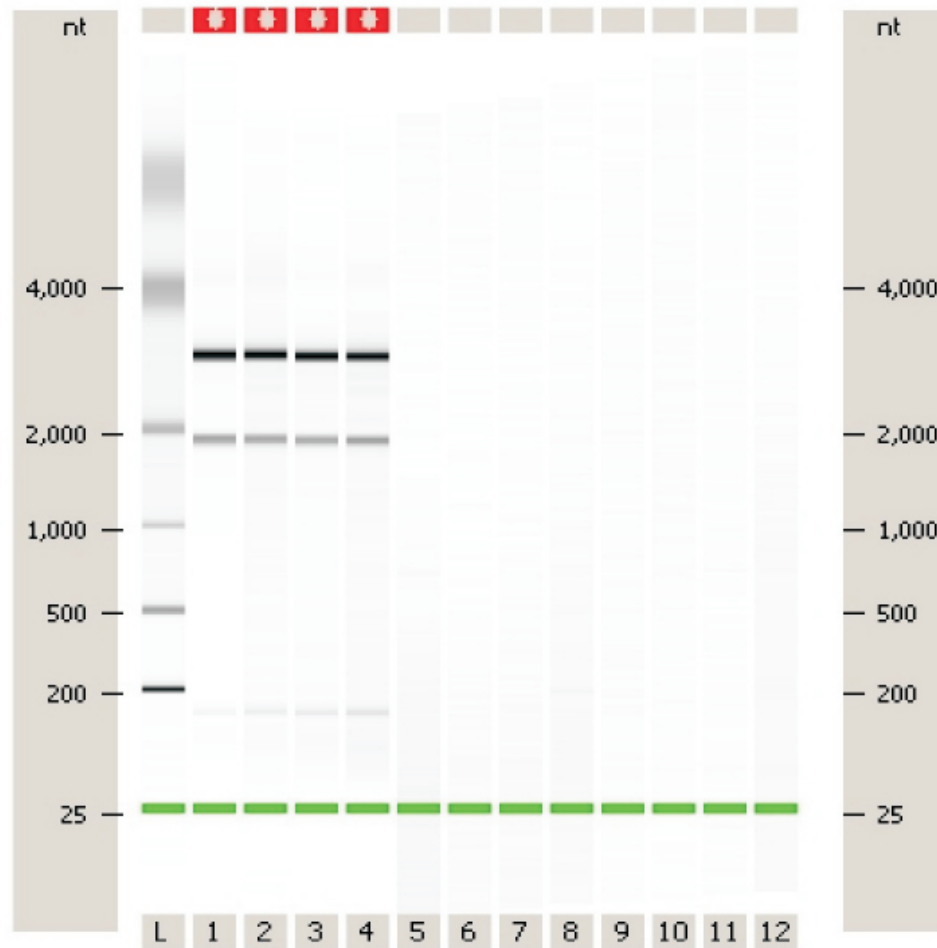
### 7.1 Expresión génica diferencial en *D. hansenii* como resultado a la exposición a altas concentraciones de sal

Las diferentes cepas de *D. hansenii* muestran diferentes niveles de osmo-tolerancia (Govind *et al.*, datos no publicados). Una curva de supervivencia de *D. hansenii* CBS 767 (Figura 2) indicó que en la presencia de concentraciones en aumento de NaCl, 2M de NaCl permitió el 40% de supervivencia de este organismo y resultó ser el umbral más alto de supervivencia para esta cepa de *D. hansenii*. Estos datos indican que esta concentración induce choque osmótico. Para estos experimentos entonces el cultivo de *D. hansenii* fue expuesto a NaCl 2M y se obtuvieron muestras a los 30 min, 3 h y 6 h. El cultivo control de *D. hansenii* se obtuvo sin haber recibido el tratamiento con sal, las cuales se denominaron tiempo 0 h. Los tres tiempos puntuales fueron seleccionados basados en Gori *et al.* (2005) (3 h) y Thomé y Trench (1999) (0.5 h). Añadimos un periodo de 6 horas para diferenciar entre los genes que se inducen de manera transitoria *versus* aquellos que se inducen de manera estable. Se extrajo ARN de las células, se determinó su concentración e integridad (Figura 3) y éste se utilizó para el análisis de genes diferencialmente expresado mediante la tecnología de microarreglos según descrito en Materiales y Métodos (Figura 1).





**Figura 2.-** Sobrevivencia de *D. hansenii* CBS 767 a diferentes concentraciones de NaCl.



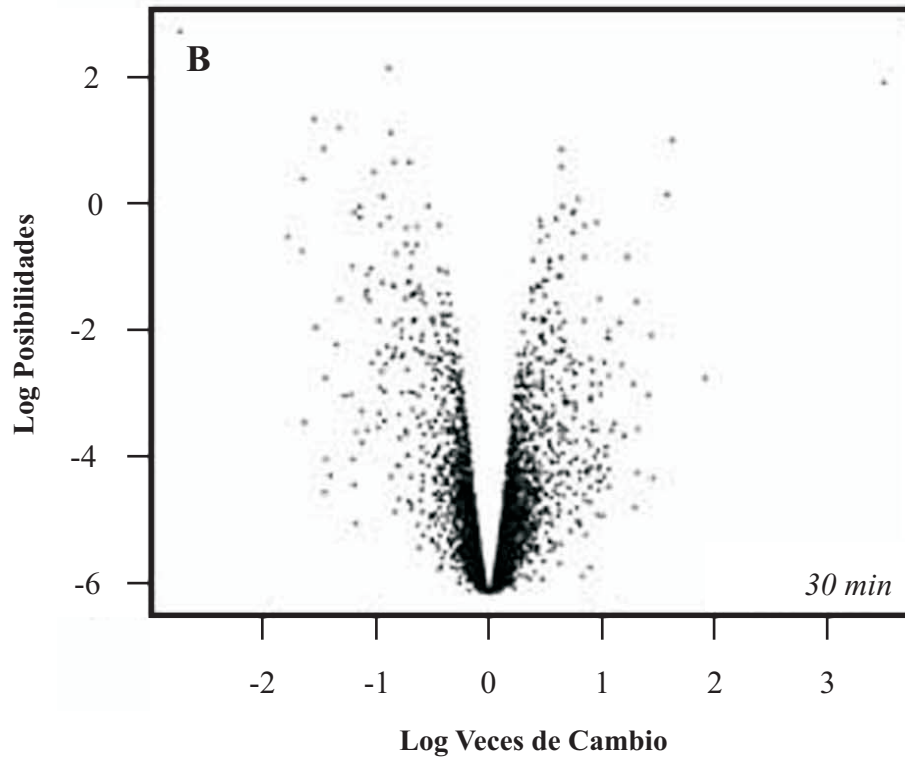
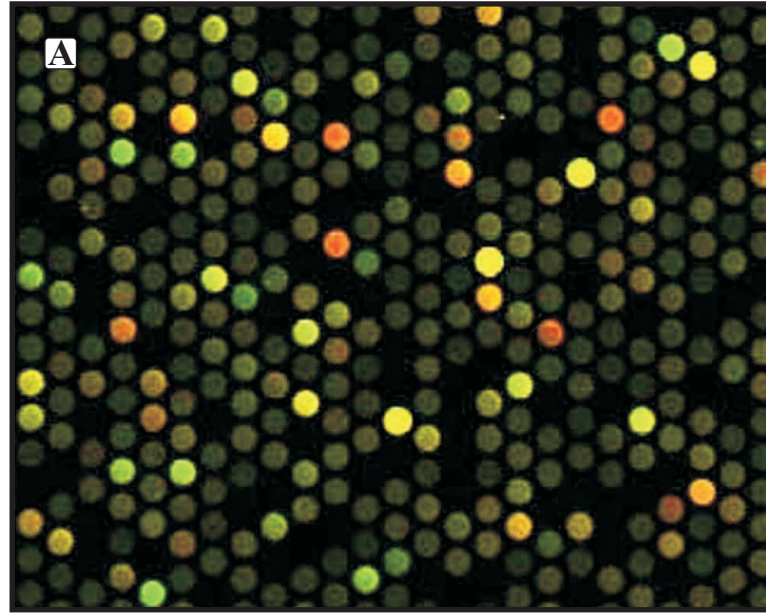
**Figura 3. Electroforesis representativa de los ARN totales extraídos de las células de *D. hansenii* CBS767 a las 0 h, 30 min, 3 h y 6 h después del tratamiento con sal. B. Electroferograma: Se graficó fluorescencia (FU) versus tiempo (s). Se observan 2 picos ribosomales correspondientes a los ribosomas 18S y 26S. No hay evidencia de degradación de las muestras.**

## 7.2 Análisis de gráficas tipo volcán

La Figura 4A muestra resultados de las hibridaciones duales que se hicieron utilizando el ARNc que fue etiquetado con marcadores fluorescentes. Los análisis estadísticos fueron obtenidos aplicando el teorema de Bayes a la *t* de student y realizando múltiples correcciones. Nuestros resultados identifican 109 genes significativos que representan 1.72% del total de 6,320 genes incluidos en el microarreglo.

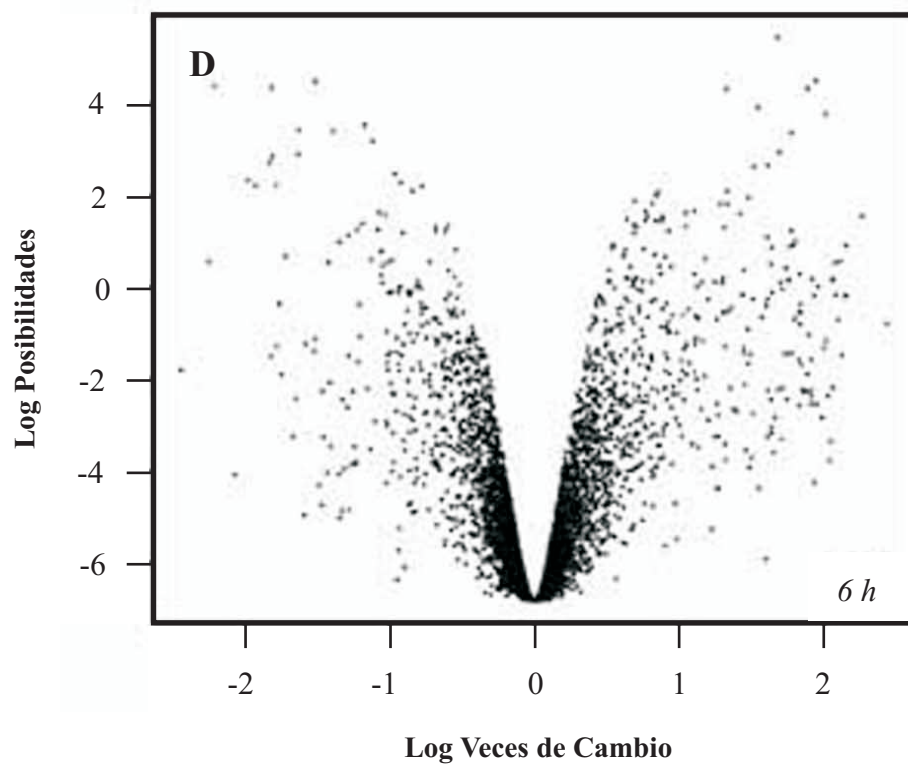
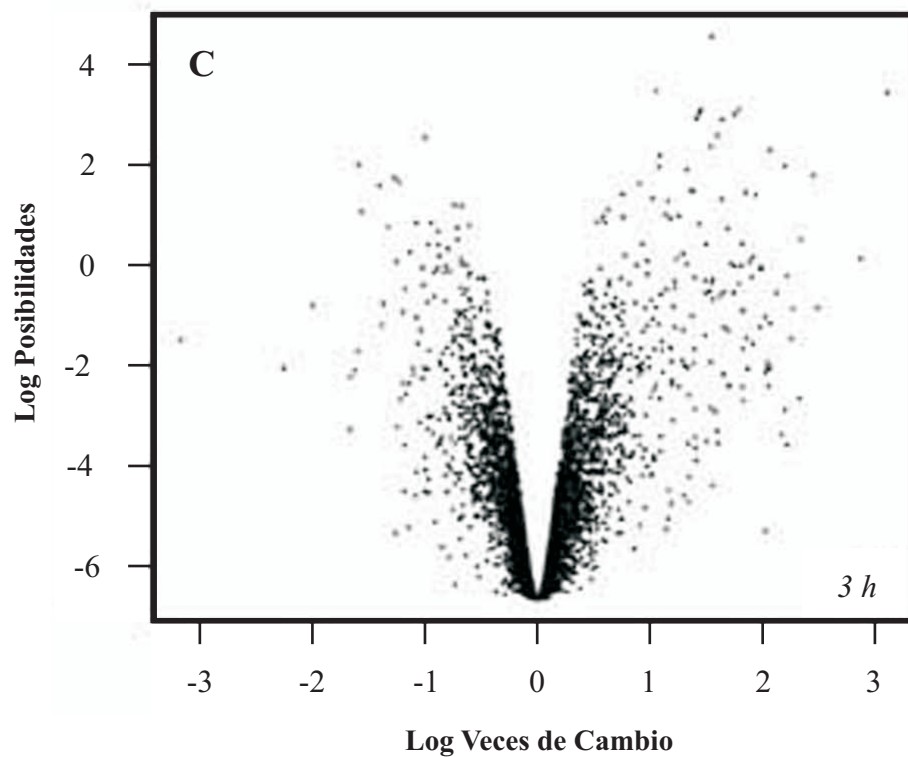
Las gráficas de Volcán se produjeron para así tener una perspectiva de la tendencia global de los datos (Figura 4B-D). En éstas el factor logarítmico de posibilidades basada en estadísticas Bayesianas fue trazado (eje de *y*) *versus* el cambio en intensidad (eje de *x*), ambos expresados como  $\log_2$ . En estos análisis, un gen se considera como expresado diferencialmente cuando tiende a valores positivos del log de posibilidades.

El análisis de las gráficas de volcán demuestra los genes significativos en cada tiempo: los genes que mostraron valores positivos del log de posibilidades con niveles variados de cambios en intensidad. Estos resultados sugieren una expresión génica significativa mucho más alta a las 3 h y 6 h en comparación con lo que se observa a los 30 min. (Figuras 4C y 4D *versus* B).



**Figura 4.- A) Imagen representativa de hibridaciones duales obtenidas en este estudio usando ARNc marcado fluorescentemente. Las figuras tipo volcán fueron generadas a partir de los datos del análisis Bayesiano para obtener una perspectiva de las tendencias globales de la expresión del genoma de *D. hansenii* en respuesta a la exposición a NaCl 2M después de 30 min (B), 3 h (C) y 6 h (D).**

Continuación Figura 4.- .....



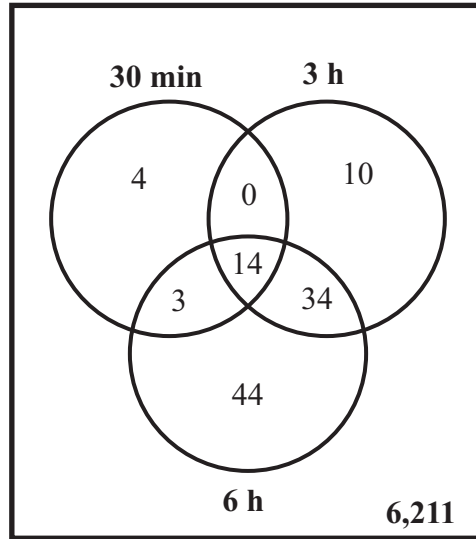
### **7.3 Análisis del diagrama de Venn**

En el Diagrama Venn (Figura 5A) se puede observar los cambios en expresión de los genes significativos en los diferentes tiempos. Se pueden identificar 4 genes (3.67% del total de genes significativos) que mostraron una expresión génica diferencial exclusivamente a los 30 min., 10 genes (9.17%) exclusivamente a las 3 h y 44 genes (40.37%) a las 6 h. Se notó además solapamiento de expresión génica en los 3 tiempos (0.5 h, 3 h y 6 h). Identificamos 3 genes (2.75%) que eran significativos tanto a los 30 min. como a las 6 h, 34 (31.19%) con expresión significativa a las 3 y 6 h, y 14 (12.84%) genes que tuvieron expresión diferencial en todos los tiempos. Interesante notar que ningún gen mostró solapamiento en su expresión entre los 30 min. y las 3 h. Un total de 6,211 genes representados en los microarreglos no mostraron expresión diferencial. Tanto el análisis del Diagrama Venn (Figura 5A) como el de las gráficas de Volcán (Figura 4D) demostraron que la mayoría de los genes se expresaron significativamente a las 6 h después del tratamiento con NaCl 2M.

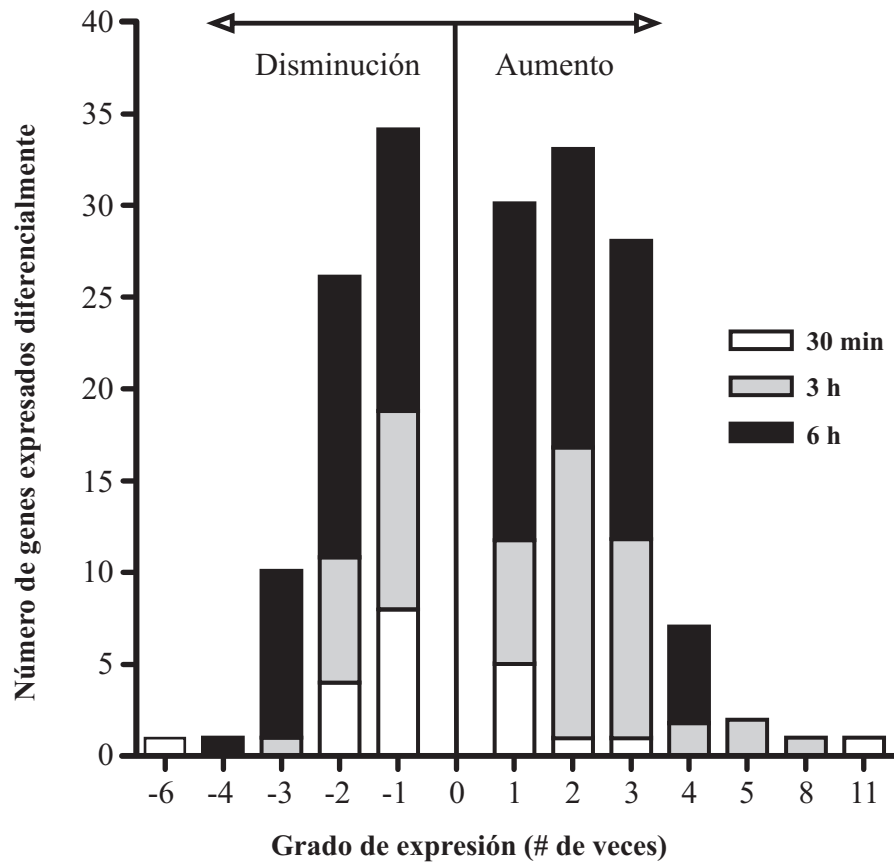
### **7.4 Análisis de niveles de expresión utilizando gráficas de barra**

La Figura 5B describe los patrones de expresión obtenido a través de tiempos puntuales con referencia a cambios en los niveles de expresión. La mayoría de los genes expresados diferencialmente muestran un incremento en la expresión: 65 de los 109

A



B



**Figura 5.- Expresión diferencial del genoma de *D. hansenii* en respuesta al tratamiento con NaCl 2M.** A) Diagrama de Venn que muestra el número total de genes que alteraron de forma significativa su nivel de expresión en cada tiempo medido. B) Grado de aumento o disminución de genes expresados diferencialmente.

genes (59.6%) están inducidos , mientras que 44 de los 109 (40.4%) genes presentan disminución en la expresión por lo menos en uno de los tiempos puntuales.

De los 21 genes significativos que se observaron a los 30 min (Figura 5A) 8 genes (38.1%) mostraron un incremento en su expresión mientras que se observó una reducción en la expresión de 13 (61.9%) genes. Se observó también a las 3 h, 39 genes (67.24 %) con un alza en la expresión y 19 (32.76%) genes con una reducción. A las 6 h, 55 de los 95 (57.89%) genes significativos presentaron un patrón de aumento en su expresión mientras que 40 (42.11%) genes un patrón de disminución. En general se observó en esta gráfica una tendencia: el número de genes cuya expresión cambió después del tratamiento con sal aumentó según pasó el tiempo. Igual que en el diagrama de Venn, la expresión génica diferencial fue más alta a las 6 h.

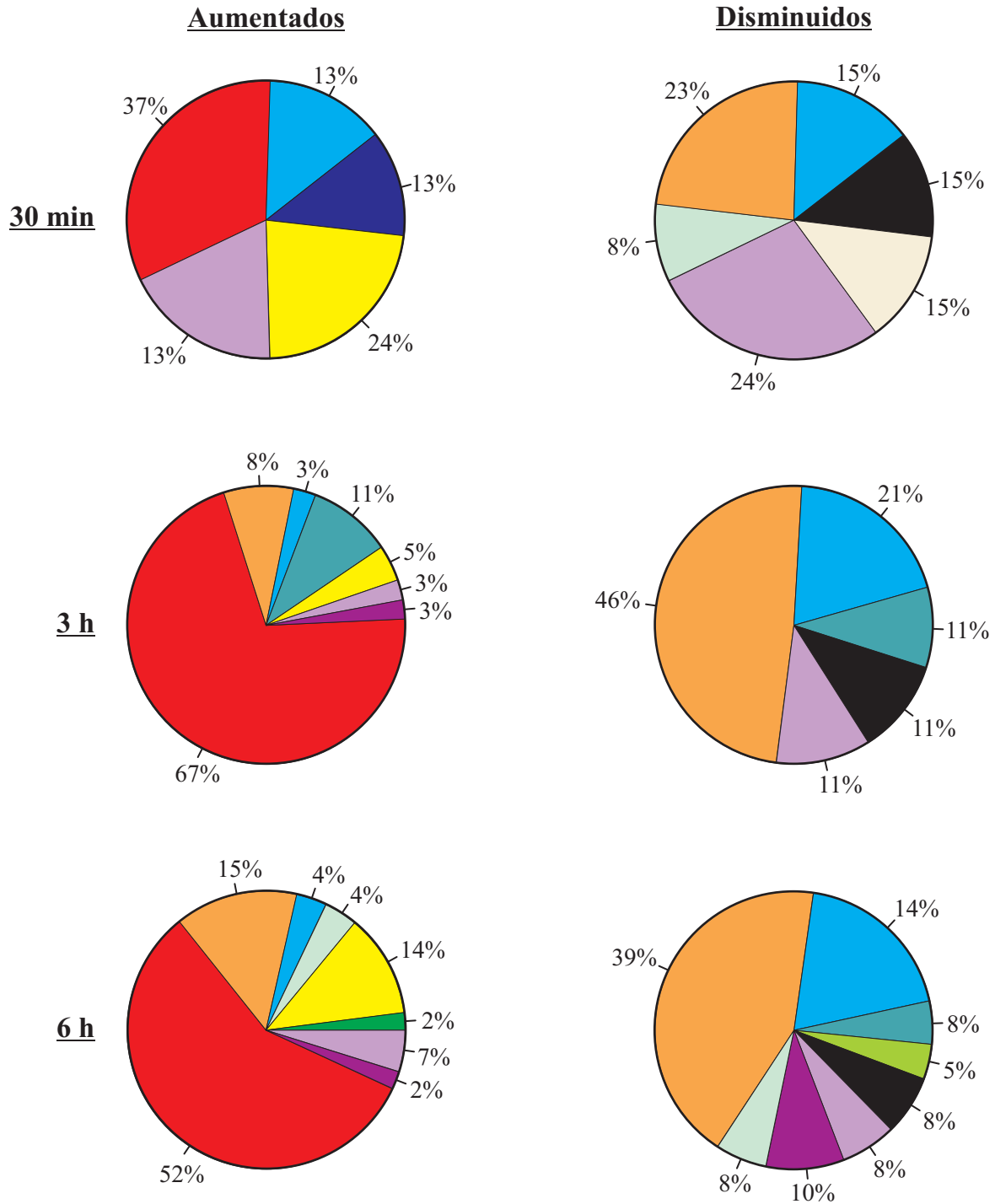
En la Figura 5B se puede notar también que la mayoría de los genes significativos muestran cambio de niveles de expresión en un rango de  $\pm 1$  to  $\pm 3$ . De los genes que presentan incremento en la expresión en los diferentes tiempos (un total de 102) 30, 33 y 28 genes (89.22%) muestran incrementos de 1, 2 y 3 veces el nivel basal, respectivamente. En 11 de los 102 genes (10.78%) se presentó un incremento en el cambio de nivel de expresión de 4 veces (7 genes), de 5 veces (2 genes), de 8 veces (1 gen), y de 11 veces (1 gen) sobre el nivel basal. Del total de 72 genes que disminuyeron su expresión en todos los tiempos puntuales, 34, 26 y 10 de los genes (97.22%) presentaron una reducción en los niveles de expresión de 1, 2 y 3 veces por debajo el nivel basal, respectivamente. Observamos 2 genes con reducción en los niveles de expresión de 4 y 6 veces, respectivamente. De estos resultados podemos concluir que cambios en los niveles de expresión tan bajos como de  $\pm 1$ , pueden representar expresión génica significativa y tener relevancia biológica.



## 7.5 Clasificación funcional de genes en una gráfica circular

Las anotaciones de los genes se obtuvieron del GenBank y se asignaron las funciones putativas basada en los niveles de homología con otros genes encontrados en los bancos de datos. Los genes se clasificaron según su relación a procesos de traducción, metabolismo de carbohidratos, metabolismo de glicerol y otros procesos celulares. Aquellos genes que no presentaron alguna similaridad con genes de otros bancos de datos o aquellos cuya función no se conocía se clasificaron bajo “Otros”. Las Tabla 1 y 2 (Vea Apéndice) presentan una lista abreviada de los genes que mostraron cambios en expresión significativos en nuestros experimentos con microarreglos .

La Figura 6 presenta las gráficas circulares (“pie charts”) obtenidas del análisis funcional de nuestros datos de expresión génica. La mayoría de los genes con aumento en los niveles de expresión a los 30 minutos están relacionado con la síntesis de proteínas (37%), funciones del mitocondria (24%), pared celular/superficie (13%) metabolismo de glicerol (13%) y metabolismo de carbohidratos (13%). Los genes relacionados al metabolismo de aminoácidos fueron inducidos a las 3 h (11%) y a las 6 h (4%). Es interesante notar que se puede observar a las 3 h (67%) y a las 6 h (52%) un aumento continuo en el por ciento de genes asociados a traducción. Otros genes que habían aumentados a los 30 minutos se redujeron mas tarde en el transcurso del experimento.



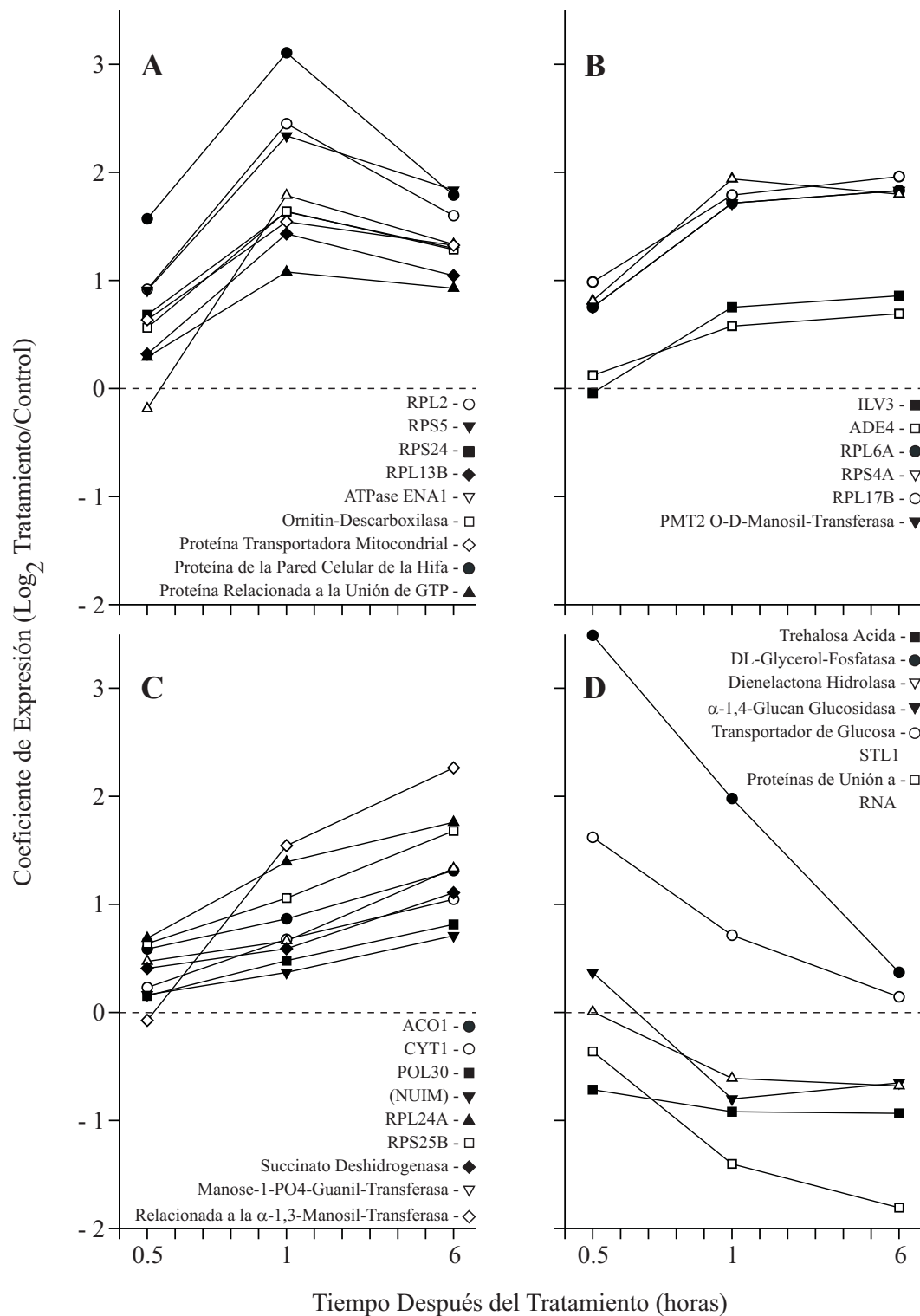
**Figura 6. Expresión temporal y funcional del genoma de *D. hansenii* en respuesta a la exposición a NaCl 2M.**

Simbología: Traducción ■; Metabolismo de Carbohidratos ■; Metabolismo de Glicerol ■; Función Mitocondrial ■; Transducción de Señales y Transcripción ■; Superficie / Pared Celular ■; Metabolismo de Aminoácidos ■; Transporte ■; Protección / Chaperonas ■; Biogénesis Vacuolar ■; Metabolismo de Lípidos ■; Metabolismo Redox ■; Otros ■.

Por otra parte, se disminuyeron los niveles de expresión a los 30 minutos de los genes asociados a pared y superficie celular (24%), otros -cuya función no se conoce- (23%), biogénesis de la vacuola (15%), metabolismo de carbohidratos (15%), metabolismo de reducción-oxidación (15%) y transducción de señales y transcripción (8%). A las 3 h los siguientes genes disminuyeron sus niveles de expresión: 21% pertenecen a aquellos involucrados en metabolismo de carbohidratos, un 46% a genes de función desconocida, 11% al metabolismo de amino ácidos, 11% al metabolismo redox, y un 11% a pared/superficie celular. Por último a la 6 h, la mayor proporción de genes (39%) perteneciente a genes cuya función no se conoce (denominado “otros” en la gráfica) también mostraron una baja en su expresión, igual que aquellos relacionados al metabolismo de carbohidratos (un 14%), un 8% de genes involucrados en el metabolismo de amino ácidos, un 5% al metabolismo de lípidos, un 8% al metabolismo de redox, un 8% a la pared/superficie celular, 10% a la función de protección celular/chaperonas, y un 8% a señales de transducción .

## **7.6 Análisis del patrón de expresión**

Realizamos un análisis del patrón de expresión para todos los genes significativos en cada tiempo puntual utilizando los coeficientes de expresión del modelo lineal computado por LIMMA (por sus siglas en inglés-Linear Model for Microarray Data). Identificamos diferentes patrones de expresión génica para todos los genes expresados diferencialmente según se había determinado en el análisis estadístico de los datos del microarreglo. En las Figuras 7A-D se encuentran grupos de genes representativos. Los datos en las gráficas representan los valores de expresión



**Figura 7.- Patrones de expresión de genes *D. hansenii* expresados significativamente en los experimentos de microarreglos.** Los genes fueron agrupados de acuerdo a sus similitudes en los coeficientes de expresión obtenidos de los análisis estadísticos Bayesianos del software LIMMA.

génica según fueron comparados al tiempo control 0. La Figura 7A presenta un grupo de genes que mostró incremento significativo en los niveles de expresión en todos los tiempos puntuales, pero demostró un pico en su expresión a las 3 h y volvió a los niveles de expresión observados a los 30 min. Este grupo de genes incluye Proteína de la Pared Celular de la Hifa, ATPasa ENA1p, Proteína Relacionada a la Unión de GTP, Proteína Transportadora Mitocondrial, Ornitin Descarboxilasa, así como otros genes que potencialmente estén relacionados a la síntesis de proteínas (RPL2, RPS5, RPS 24, RPL13B).

La Figura 7B muestra los patrones de expresión de dos grupos de genes, aquellos que presentan incrementos significativos de niveles de expresión en todos los tiempos puntuales y aquellos genes con diferentes niveles de expresión a las 3 y 6 h. Estos grupos de genes incluyen en el primer grupo, PMT2 O-D Manosil Transferasa y RPS-4A, RPL17B, RPL6A (estos últimos relacionados a procesos de traducción) y ILV3 y ADE4, en el segundo grupo. La Figura 7C incluye un grupo de genes significativos que presentan un aumento en expresión continua que va desde los 30 min. hasta las 3 y 6 h.

La Figura 7D también tiene 2 tipos de genes. El primer grupo, que incluye a DL-Glicerol Fosfatasa y un transportador de glucosa STL1, muestran un aumento significativo en los niveles de expresión a los 30 min. al compararlo con los valores control. Además se observa que en los tiempos de 3 y 6 h ambos genes exhiben una marcada disminución en los niveles de expresión. Esto sugiere que estos genes son inducidos en una etapa temprana, inmediata y de manera transitoria. El segundo tipo de grupo de genes presentados en esta gráfica incluyen  $\alpha$ -1-4 glucan glucosidasa, Dienelactona hidrolasa, Trealosa ácida. Todos estos genes mencionados anteriormente están relacionados al metabolismo de azúcares. Por último, el único gen identificado en nuestro estudio que está asociado al procesamiento de ARN – (dominio de unión a ARN).

La gráfica muestra como estos 4 genes exhiben una tendencia continua de represión alcanzando el máximo a las 3 y/o 6 h.

### **7.7 Validación de los genes ENA1 y HWP1 utilizando qRT-PCR**

Experimentos de validación se realizaron para los genes ENA1 y HWP1 (Proteína de la pared celular de la hifa) utilizando la tecnología PCR-Tiempo Real. La selección de estos genes para estudios de validación se basó en los análisis estadísticos previos y en el conocimiento relacionado a la regulación de genes en levaduras cuando éstas se encuentran en estrés osmótico. Curvas estándar fueron generadas para cada uno de los genes de interés (ENA1 y HWP1) y para el gen de referencia (ACT1, actina) (Figura 8). Los  $R^2$  de cada una de las gráficas fueron  $>0.97$  (el  $R^2$  debería estar tan cerca de 1.0 como sea posible) y la eficiencia de amplificación debe estar en un rango entre 90-110%, indicando que la amplificación a los diferentes concentraciones fue consistente.

Se realizaron análisis de curva de disociación para ENA1, HWP1 y ACT1 en los diferentes tiempos puntuales para identificar productos secundarios en las reacciones de amplificación. Se graficaron los valores de fluorescencia relativa contra la temperaturas de disociación. Se observó un solo pico en el producto de amplificación (para ACT1 a los  $79^\circ\text{C}$ , para ENA1- $77^\circ\text{C}$  y para HWP1- $85^\circ\text{C}$ ) denotando la especificidad de los productos

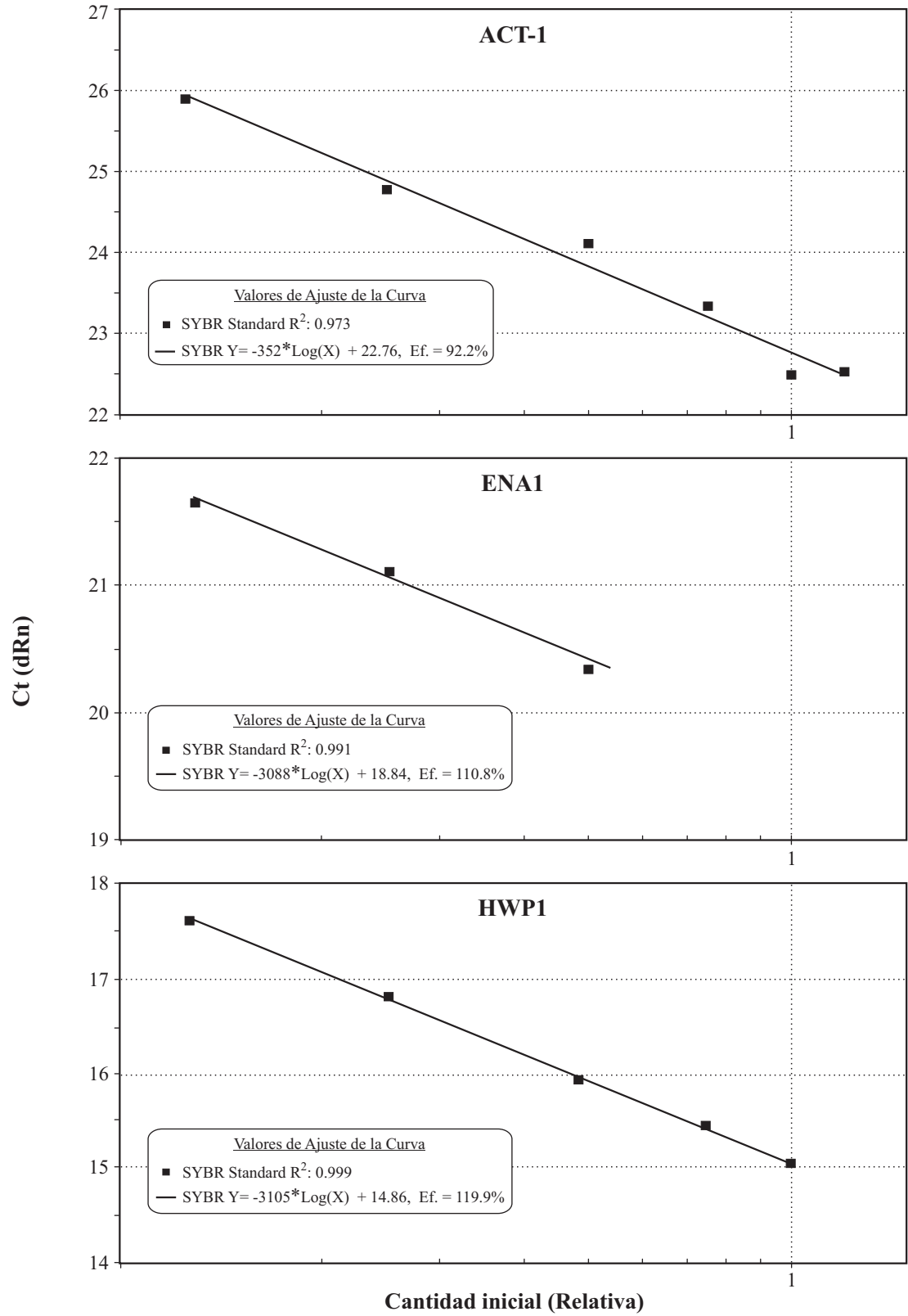


Figura 8.- Curvas estándar para el gen de referencia (normalizador) ACT1, ENA1 y HWP1 de *D. hansenii* CBS767.

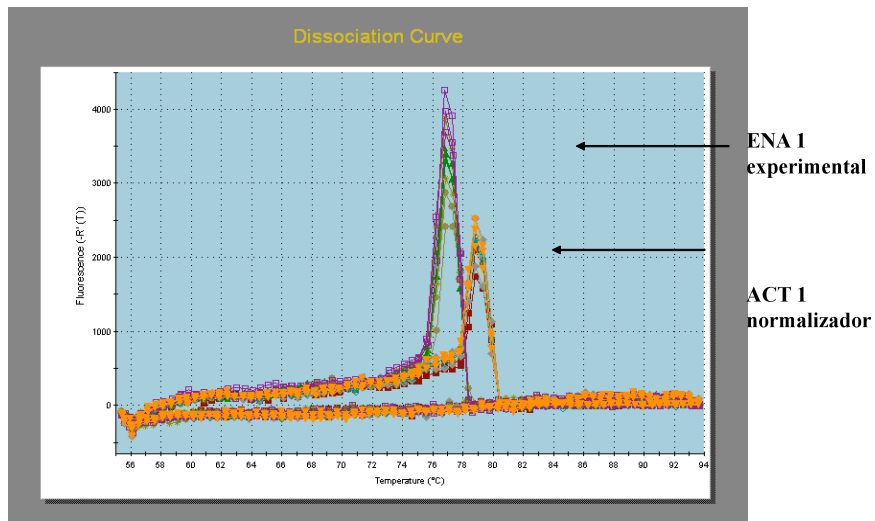
amplificados (Figura 9). Se ha encontrado que el aumento en expresión del gen ENA1 representa una respuesta celular decisiva ante el reto de hiper-salinidad [Proft y Serrano, 1999]. Este gen codifica para una ATPasa tipo P, y existe evidencia que estas ATPasas intervienen en la extrusión de sodio, litio y potasio en levaduras (Haro *et al.*, 1991) y juegan un papel muy importante en la tolerancia de sodio y litio (Prista *et al.*, 1997). El estudio estadístico de la varianza unidireccional (ANOVA) para el gen ENA1 identificó diferencias significativas entre los diferentes tiempos puntuales ( $F(3,11)=10.07$  (\*\*\*)  $p < 0.005$ ). Diferencias específicas entre los grupos se detectaron con el análisis de comparación “Tukey's Multiple Comparison post-hoc analysis” (0 *versus* 3.0 h y 0 *versus* 6.0 h (\* $p < 0.05$  para cada comparación) 0.5 *versus* 3.0 h y 0.5 *versus* 6.0 h (+  $p < 0.05$  para cada comparación) (Figura 10A).

La pared celular de los hongos es esencial para mantener el balance osmótico de la célula y para crear y mantener la forma de la misma. Enfoques genómicos y proteómicos han señalado claramente que las levaduras ascomicetas incorporan un gran número de proteínas en sus paredes celulares y que este proceso de incorporación está rigurosamente regulado. La población de proteínas de la pared celular puede variar en su composición según la fase del ciclo celular, o condiciones ambientales o la etapa de desarrollo en que se encuentre la célula (De Groot *et al.*, 2005). HWP1, una proteína-GPI ligada a la pared celular, es un gen regulado que se expresa en los tubos germinativos y en las hifas verdaderas (Staab *et al.*, 1996). El gen HWP1 se conoce por sus propiedades adhesivas y su expresión ha sido vinculada a la virulencia de las hifas en *C. albicans* (Bahn and Sundstrom, 2001). Este gen codifica para una manoproteína de la superficie



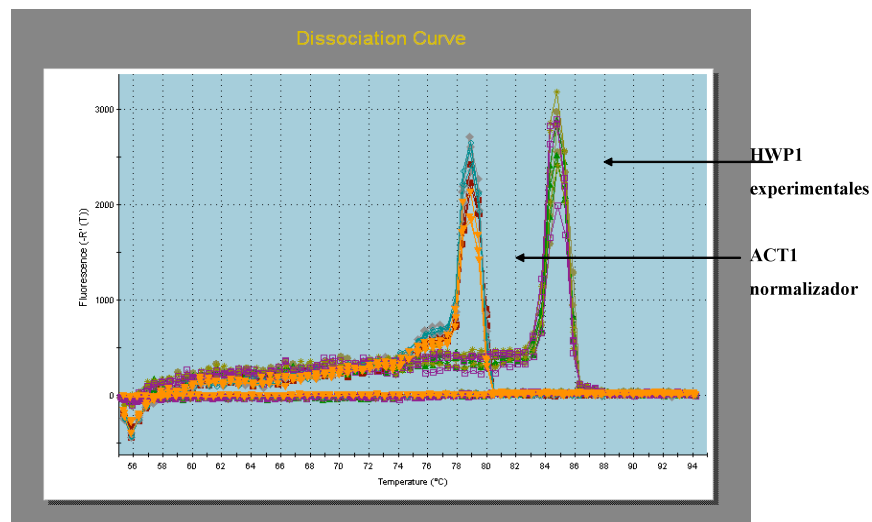
## Curva de Disociación

ENA1 de *D. hansenii* CBS767, 9-20-07

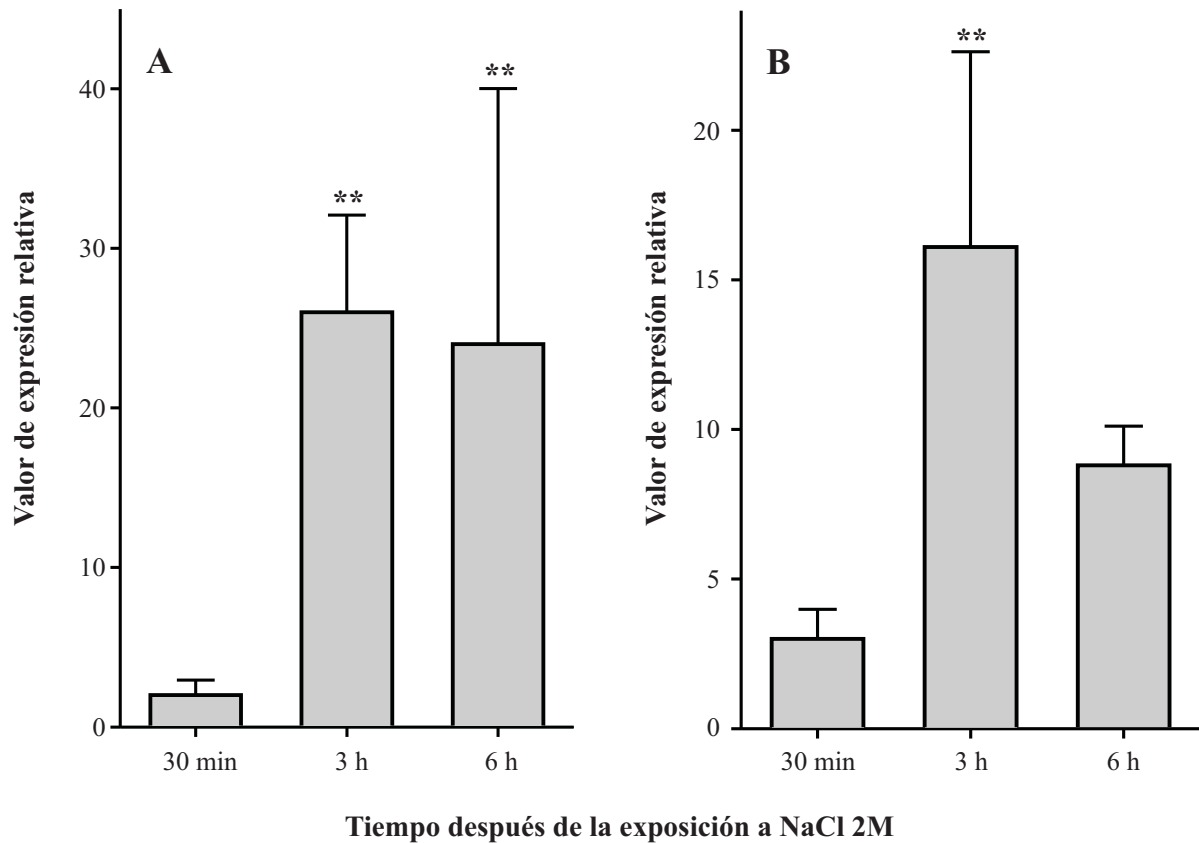


## Curva de Disociación

HWP1 de *D. hansenii* CBS767 - 10-02-07



**Figura 9.** Curvas de disociación de los productos de los genes de ENA1 y HWP1 en los diferentes tiempos puntuales (30 min, 3 h y 6 h). Se graficaron los valores de fluorescencia relativa contra la temperaturas de disociación. Las gráficas se exportaron del programa del analizador Mx3005P de Stratagene-Agilent Technologies.



**Figura 10.- Valores de expresión relativa de los genes ENA1 (A) y HWP1 (B) obtenidos de los estudios de validación usando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real.** Los asteriscos sobre las barras de las figuras indican diferencias significativas entre tiempos de exposición dentro del mismo gen, como fue revelado por el Análisis ANOVA de una sola vía con  $F_{3,11} = 10.07$   $***p < 0.005$  para ENA1 y  $F_{3,11} = 20.77$   $***p < 0.005$  para HWP1. Las diferencias específicas fueron detectadas mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey. Para ENA1 0 vs 3.0 h y 0 vs 6.0 h con una \*  $p < 0.05$  en ambas y 0.5 vs 3.0 h, así como 0.5 vs 6.0 h con una +  $p < 0.05$  también en ambas. En el caso de HWP1, 0 vs 3.0 h con una  $***p < 0.001$ ; 0 vs 6.0 h con una \*  $p < 0.05$ ; 0.5 vs 3 h con una ++  $p < 0.01$ ; y 3.0 vs 6.0 h con una #  $p < 0.05$ .

externa que se cree se orienta por su dominio amino terminal expuesto hacia fuera. Es este carboxilo terminal que se integra de manera covalente con el  $\beta$ -glucano de la pared celular logrando que la unión de la hifa con el huésped sea estable y covalente y no fácil de revertir por agentes antifúngicos (Castrillón *et al.*, 2005).

El análisis de la varianza unidireccional (ANOVA) también se realizó para el gen HWP1 con los datos obtenidos de los estudios del qRT-PCR para validar el resultado del microarreglo. Este análisis identificó diferencias significativas entre los tiempos puntuales ( $F(3,11)=20.77$ ,  $***p<0.0005$ ). Mas específicamente, el test de Tukey de múltiples comparaciones post-hoc detectó diferencias significativas en las comparaciones entre el 0 *versus* 3.0 h ( $***p < 0.001$ ), el 0 *versus* 6.0 h ( $*p < 0.05$ ), el 0.5 *versus* 3 h ( $++p < 0.01$ ) y el 3.0 *versus* 6.0 h ( $#p < 0.05$ ) (Figura 10B). En general, los datos obtenidos del qRT-PCR en ambos genes confirman el patrón de expresión que se observó en los experimentos con los microarreglos, sugiriendo que los genes ENA1 y el gen de HWP1 están involucrados potencialmente en la osmo-tolerancia de *D. hansenii*.

## 8. DISCUSIÓN

Se utilizaron microarreglos para delinear el perfil de expresión génica relacionado al proceso de osmo-adaptación en *D. hansenii*. Los resultados obtenidos apoyaron la noción que este organismo está altamente adaptado a condiciones de hiper-salinidad. Observamos como una concentración alta de sal produce un estrés inicial que induce 2 tipos de genes simultáneamente: genes que se conoce que son expresados bajo estrés osmótico y por otra parte, aquellos genes relacionados a síntesis de proteínas y mantenimiento celular. Luego del estrés inicial este organismo se sobrepone al estrés osmótico aumentando la expresión de genes involucrados en la síntesis de proteínas.

Se ha comprobado que células que están totalmente adaptadas a un medio ambiente de condiciones extremas pueden reanudar proliferación, se caracterizan por los ajustes que realizan en su metabolismo energético y de oxidación –reducción, mantienen un nivel alto de glicerol y sus propiedades a nivel de pared/superficie celular se muestran alteradas (afectadas) (Hohmann, 2002).

Al resumir nuestros resultados en los puntos más importantes, se destacan cuatro: Primero, los resultados obtenidos en la transcripción del gen GPD1 (glicerol 3-fosfato deshidrogenasa) fueron sorprendentes pues su rol en la biosíntesis de glicerol ha sido ampliamente documentada y en nuestro estudio no se detectaron cambios significativos.

Segundo, nuestros resultados demostraron un alza en la regulación de genes que codifican para proteínas ribosomales. Tercero, es notable el número de genes inducidos relacionados a funciones del mitocondria, lo que podría indicar su participación en mantener ajustadas las actividades respiratorias y metabólicas del organismo, realzando su capacidad para la osmo-adaptación. Cuarto, se observaron cambios en los genes asociados a la pared/superficie celular, algunos de estos fueron inducidos y otros reprimidos, indicando cuan dinámica es la pared celular, siempre remodelándose de acuerdo a las condiciones externas (Adams, 2004) . Cada uno de estos puntos sera discutido a continuación.

### **8.1 Biosíntesis de glicerol y osmoadaptación**

El proceso de osmo-adaptación ha sido estudiado ampliamente en organismos halotolerantes, como lo son las levaduras y las algas, (Hasegawa, 2000; Ventosa *et al.*, 2004). El añadir sal a *S. cerevisiae*, activa la ruta metabólica quinasa de MAP resultando en un aumento en la expresión de GPD1 y GPP1 (Ansell *et al.*, 1997; Keyse, 2000; Kultz y Burg, 1998). El aumento en la expresión causa un aumento en la síntesis de glicerol, un osmolito inerte que contrarresta el efecto de hiper-osmolaridad extracelular (Mager y Varela, 1993; Thome y Trench, 1999; Estruch, 2000; Gonzalez-Hernandez y Peña, 2002). Esta actividad del gen de GPD1 en *S. cerevisiae* ha sido estudiada utilizando northern y por microarreglos de expresión (Rep *et al.*, 2000; Thome y Trench, 1999; Gori *et al.*, 2005; Hirasawa *et al.*, 2006; Causton *et al.*, 2001).

Aunque los resultados de nuestros microarreglos mostraron también un aumento en los niveles de ARNm del gen de GPD1, tales cambios no alcanzaron valores estadísticos significativos ya que se utilizaron protocolos estadísticos muy rigurosos. Nuestros resultados están de acuerdo con Hohmann (2002) donde la expresión de GPD1 y GPP2 en *S. cerevisiae* es activada rápida y transitoriamente por un cambio osmótico. El mismo estudio reportó que en células adaptadas a crecer en un medio de una alta osmolaridad el ARNm es inducido solo de 2-5 veces dependiendo del nivel del estrés osmótico (Albertyn *et al.*, 1994; Ansell *et al.*, 1997; Ericksson, 2000; Larsson, 1993; Rep *et al.*, 1999). Nuestros resultados también mostraron que con la excepción de GPP1 y ENA1 (Figure 7D) la transcripción de otros genes que comúnmente están inducidos por estrés osmótico en *S. cerevisiae*, tales como cinasa de dihidroxyacetona (DAK1), fosfoglucomutasa (PGM2), y alpha, alpha-trealose-fosfato sintasa (TPS3) (Almagro *et al.*, 2001), ninguno de ellos fueron inducidos significativamente en *D. hansenii*.

Los siguientes genes los han asociados también a la tolerancia a la sal de *D. hansenii*: TRK- involucrado en el transporte de  $K^+$  (Prista *et al.*, 2007), HAL2- una fosfatasa sensitiva a la sal (Aggarwal *et al.*, 2005), NHX1- un gen que codifica para un intercambiador de  $Na^+/H^+$  (Montiel and Ramos, 2007) y NHA1- un gen que codifica para un cation de metales alcalinos en la membrana plasmática (Velkova and Sychrova, 2006, Banuelos, 1998). Nuestros microarreglos no detectaron inducción significativa en ninguno de estos genes.

## 8.2 Proteínas ribosomales

Se ha observado frecuentemente en *S. cerevisiae* que los genes que codifican para factores involucrados en la síntesis de ARNr y ensamblaje de los ribosomas se reprimen durante estrés salino (Rep *et al.*, 2000, Causton *et al.*, 2001; Grigull *et al.*, 2004). Esa reducción de proteínas ribosomales permite que la energía celular sea reorganizada o desviada para lograr un aumento de genes asociados a protección celular, aun así manteniendo la síntesis de proteínas a un nivel basal (Jelinsky y Samson, 1999).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio en *D. hansenii* demuestran que después de tratamiento con sal aumentó significativamente la expresión de un gran número de genes cuyo nivel de ARNm codifica para proteínas ribosomales o proteínas involucradas en traducción y éste en todos los periodos de tiempo del estudio. Parece ser que en *D. hansenii* (CBS 767) de haber algún paro celular debido a choque osmótico esté ocurriendo antes del primer periodo de tiempo (30 min.) de nuestro análisis de microarreglos y donde las células ya están en proceso de recuperación.

Posas *et al.* (2000) reportaron resultados parecidos en un estudio de microarreglos en células de *S. cerevisiae* que estuvieron en contacto con NaCl (0.4 M) por 10 min. y hubo inducción de una gran cantidad de componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas. Esto incluyó 31 de los genes que codifican para proteínas ribosomales y también se detectó aumento en el nivel de varias aminoacil ARNt sintetasas y de factores de iniciación de la traducción incluyendo *TIF1* y *TIF2*, *PRT1*, *TIF11*, *HYP2*, y *CDC95*. En

este estudio con *D. hansenii* se observó la inducción de un total de 28 genes ribosomales, de un factor de iniciación de la traducción (PRT1) y una arginil ARNt sintetasa.

En su análisis de expresión génica por microarreglos de *S. cerevisiae* sometida a alta salinidad, Yale y Bohnert (2001), reportaron que aproximadamente la mitad de todos los transcritos inducidos (42%; 44 ORFs) se originaron de la categoría de genes asociados al metabolismo de proteínas. Estos resultados están de acuerdo con los presentados en este estudio con *D. hansenii* donde aproximadamente la mitad (46%, 30 ORFS) de los transcritos inducidos pertenecen a la categoría de síntesis de proteínas. Yale y Bohnert (2001), también encontraron que los patrones de expresión a los 10 y 30 min eran parecidos, donde 67% de los ORF's inducidos a los 10 min eran exactos a aquellos inducidos a los 30 min y todos asociados al metabolismo de proteínas. A los 90 min, solo 13% de los genes inducidos estaban relacionados a componentes del metabolismo de proteínas.

Nuestros resultados reflejaron una diferencia muy marcada entre los patrones de expresión de los componentes de síntesis de proteínas a los 30 min (37%) y a las 3 h (67%), y mantuvieron ese aumento (52%) a las 6 h. Yale y Bohnert atribuyeron la diferencia en la inducción de proteínas ribosomales (10 y 30 min) a un ajuste metabólico temprano durante el choque por estrés salino por parte de *S. cerevisiae*, mientras que nuestros resultados de una inducción que va en aumento a través de los periodos de tiempo estudiados, sugieren que un mecanismo regulador de la traducción de genes desempeña un papel en la respuesta de osmo-regulación en *D. hansenii*.



Hirasawa *et al.* (2006) compararon la función de genes entre una cepa de *S. cerevisiae* para la elaboración de cerveza y una cepa de laboratorio del mismo organismo, después que ambas fueron sometidas a estrés salino. Los autores llegaron a la conclusión de que la cepa para la elaboración de cerveza presentó una respuesta mas rápida y pudo adaptarse mejor que la otra cepa debido al mantenimiento de los niveles de expresión de genes relacionados a la biogénesis y ensamblaje de proteínas como también el poder continuar la síntesis de proteínas a pesar de las altas concentraciones de sal.

El alza en la regulación de proteínas ribosomales se ha observado también en algunos organismos en el proceso de aclimatación a ambientes extremos. En las plantas se ha observado que para aclimatarse al frío muestran cambios en expresión génica y síntesis de proteínas *de novo* (Guy, 1990; Thomashow, 1998). Puede ser que bajo condiciones de temperaturas bajas la inducción de proteínas ribosomales realce el proceso de traducción o ayude con el ensamblaje y funcionamiento apropiado de los ribosomas (Kim *et al.*, 2004). Un mecanismo parecido puede estar operando en *D. hansenii* durante el estrés salino, el cual puede resultar en una reducción muy efectiva de disponibilidad de agua intracelular. Este estado de preparación a nivel de transcripción en este organismo puede indicar el papel tan importante que tiene la regulación de traducción en la osmo-adaptación. Por otro lado, es muy importante el descubrimiento de genes que no han sido reportados o identificados todavía, y que demuestren tener un incremento en transcripción y puedan estar involucrados en el proceso de osmo-adaptación de este organismo.

## 8.3 Otros Genes

### 8.3.1 Genes con incremento en su expresión

Se observaron en nuestros microarreglos otro grupo de genes inducidos perteneciente a aquellos que codifican para funciones relacionadas al mitocondria. Se ha documentado que *S. cerevisiae* requiere de energía a nivel celular para manejar el estrés, reparar daños y mantener homeostasis (Hohmann, 2002). Nuestros resultados revelaron un promedio del 14% del total de genes inducidos en *D. hansenii* (Figura 6) que pertenecían a la categoría de genes asociados al mitocondria. Este resultado es consistente con la habilidad de este organismo de enfrentar la exigencia de energía celular requerida.

La pared celular es esencial para mantener la morfología celular y como protección del ambiente externo al preservar su integridad osmotica (Garcia *et al.*, 2004). Es de esperarse que el estrés osmotico afecte los procesos relacionados al ensamblaje de la pared/superficie celular (Rep *et al.*, 2000; Alonso-Monge *et al.*, 2001). Consistente con estos datos, otra categoría de genes inducidos en nuestros microarreglos fueron aquellos que codifican para biogénesis y modificación de la pared/superficie celular (un 7.6% del total de genes inducidos) (Figura 6). Entre los genes inducidos de la pared celular se encontraron aquellos que son necesarios para la síntesis de manoproteínas (MNT1, MNN1, PMT2 y PSA1). Además, se observaron otros genes inducidos que codifican para proteínas involucradas en el movimiento de moléculas o iones a través de una membrana de fosfolípidos , cada uno con su exigencia energética, entre ellos, STL1, un

simporter de glicerol/H<sup>+</sup>, y todos colaborando a mantener la integridad de la pared celular.

### **8.3.2 Genes con disminución en su expresión**

Contrario a fuentes ya documentadas (Hirasawa *et al.*, 2006; Rep *et al.*, 2000), que reportan que el estrés salino causa la inducción de chaperonas y genes asociados a las funciones de protección celular, nosotros observamos la represión significativa de los genes que codifican para proteínas de choque térmico como HSP12 y DDR48, como también la toxina “killer” KHR1 y en la expresión de transportadores asociados a la vacuola. Estos mismos genes fueron inducidos en *S. cerevisiae* cuando fue sometida a estrés osmótico (Hohmann, 2002; Rep *et al.*, 2000). La ausencia de una respuesta de proteínas de choque térmico en nuestros estudios puede sugerir que el umbral para inducir una respuesta al estrés en *D. hansenii* es más alto que en *S. cerevisiae*.

### **8.3.3 Genes no caracterizados**

Nuestros microarreglos revelaron cambios en expresión génica en 18 genes cuya función se desconoce. De éstos, 4 fueron inducidos y 14 fueron reprimidos (Función desconocida fue clasificada como otros en la Figura 6.) La caracterización y los estudios de las secuencias codificantes de estos genes desconocidos y las secuencias reguladoras de aquellos genes altamente regulados pueden ayudar a dirigirnos por caminos de comprensión en la capacidad de sobrevivencia o tolerancia al estrés que posee *D.*

*hansenii*. Una ventaja adicional sería el desarrollo de herramientas moleculares nuevas para la expresión de genes heterólogos en *D. hansenii*.

**Tabla 1.- Respuesta al estrés salino en levaduras medida por la tecnología de microarreglos.** Se destacan solo esos resultados con marcado aumento (+) o disminución (-) en la expresión génica. \* = no se reportó resultado.

<b>Autores</b>	<i>Posas et al.</i>	Yale & Bohnert	<i>Rep et al.</i>	<b>Nuestros Resultados</b>
<b>Organismo</b>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>D. hansenii</i>
<b>Cloruro de Sodio</b>				
Concentración	0.4 M	1.0 M	0.7 M	2.0 M
Tiempo de Inducción	10 min	10, 30 y 90 min	45 min	30 min, 3 h, 6 h
Resultados	$\Delta$ en Expresión	$\Delta$ en Expresión	$\Delta$ en Expresión	$\Delta$ en Expresión
<b>Glicerol</b>				
GPP1	*	4.3 +	4 +	11 +
GPD1	76.4 +	39.1 +	36 +	1 +
<b>Proteínas Ribosomales</b>	7% + (> 5 x)	67% + (10, 30 min) 55% - (90 min)	Mayoría -	37% + (30 min) 67% + (3 h) 52% + (6 h)
<b>Pared Celular</b>				
$\beta$ 1,3 D-glucano sintetasa	*	*	> 2.1 +	4.63 -
<b>Protección Celular</b>				
HSP12	*	62.7 +	> 114 +	3.94 -
DDR48	> 25.5 +	4.3 + (90 min)	*	11.65 -
<b>Metabolismo de Azúcares</b>				
STL1	89.8 +	14.3 +	> 34 +	3 +
<b>ATPasas / Homeostasis</b>				
ENA1	7.4 +	+ (después de 30 min)	> 8.4 +	3.45 + (3 h)
<b>Otros</b>				
Vacuola	15.3 +	*	6.0 +	1.85 -
CHA12	*	*	8.7 +	2.96 -
Aldehido Deshidrogenasa	66.7 +	*	> 40 +	1.76 -

## 9. CONCLUSIONES

1. La tecnología de microarreglos es apropiada para estudiar en forma precisa la expresión transcripcional del genoma completo de *Debaryomyces hansenii* en respuesta a la exposición a NaCl 2M.
2. De un total de 6,320 genes, 109 modificaron significativamente su nivel de expresión en respuesta a la presencia de los altos niveles de sal. Entre los cuales están los genes asociados a proteínas ribosomales observaron un incremento de actividad, mientras que aquellos involucrados en protección celular presentaron una reducción en la misma en algunos de los tiempos puntuales.
3. Entre los genes de *D. hansenii* que observaron un incremento en su expresión, 50% se identificaron con genes asociados a traducción, 21% se relacionaban con funciones del mitocondria y un 15% se asociaron a funciones aun desconocidas. Por su parte los genes que presentaron una disminución en su expresión, una mayoría (45%) se encontraron asociados a funciones aun desconocidas y un 20% a funciones de protección celular.
4. El hecho que 50% de los genes que exhibieron un alza en su expresión estén asociados a la maquinaria de traducción sugiere que un mecanismo regulador de la traducción de genes desempeña un papel en la respuesta de osmoregulación en *D. hansenii*.

5. El número de genes cuyos niveles de expresión se modificó después del tratamiento con sal; cambió con el transcurso del tiempo, observándose las mayores diferencias significativas a las 6 h de iniciado el experimento.
6. Los experimentos de validación con qRT-PCR pudieron confirmar los patrones de expresión para los genes seleccionados, ENA1 y HWP1.
7. Con la expresión de GPP1 y ENA1, en nuestros microarreglos no se detectó inducción significativa en otros genes que comúnmente están inducidos por estrés osmótico en *S. cerevisiae*, y otros que han sido asociados a la tolerancia de sal en *D. hansenii*.
8. Los resultados muestran que muy pocos genes son inducidos como respuesta a estrés osmótico indicando que *D. hansenii* esta preparada para sobrevivir en ambientes extremadamente salinos.

## 10. LITERATURA CITADA

1. Acuña E. 2003. Métodos estadísticos para datos de microarreglos. Departamento de Matemáticas, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez.
2. Adams DJ. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150:2029-35.
3. Adler L, Gustafsson L. 1980. Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Bacteriol.* 162: 300-306.
4. Adler L, Blomberg A, Nilsson A. 1985. Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Bacteriol.* 162: 300-306.
5. Adler L. 1986. Physiological and biochemical characteristics of the yeast *Debaryomyces hansenii* in relation to salinity. New York: Cambridge.
6. Aggarwal M, Bansal PK y Mondal AK. 2005. Molecular cloning and biochemical characterization of a 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase from *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* 22: 457-70.
7. Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM, y Prior BA. 1994. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* 14:4135-44.
8. Almagro A, Prista C, Castro S, Quintas C, Madeira-Lopes A, Ramos J, Loureiro-Dias MC. 2000. Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 56: 191-197.
9. Almagro A, Prista C, Benito B, Loureiro-Dias MC, Ramos J. 2001. Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Bacteriol.* 183: 3251-3255.



10. Alonso-Monge R, Real E, Wojda I, Bebelman JP, Mager WH, Siderius M. 2001. Hyperosmotic stress response and regulation of cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae* share common functional aspects. *Mol. Microbiol.* 41:717–730.
11. Ansell R, Granath K, Hohmann S, Thevelein JM, Adler L. 1997. The two isoenzymes for yeast NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *Embo J* 16: 2179-87.
12. Bahn YS, Sundstrom P. (2001). CAP1, an Adenylate Cyclase-Associated Protein Gene, Regulates Bud-Hypha Transitions, Filamentous Growth, and Cyclic AMP Levels Is Required for Virulence of *Candida albicans*. *J. Bacteriol* 183: 3211–3223.
13. Bansal PK, Mondal AK. 2000. Isolation and sequence of the HOG1 homologue from *Debaryomyces hansenii* by complementation of the hog1Delta strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16: 81-8.
14. Bansal PK, Sharma P, Mondal AK. 2001. A PBS2 homologue from *Debaryomyces hansenii* shows a differential effect on calcofluor and polymyxin B sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 18: 1207-16.
15. Banuelos MA, Sychrova H, Bleykasten-Grosshans C, Souciet JL, Potier S. 1998. The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* 144:2749–2758.
16. Blomberg A. 1995. Global Changes in Protein Synthesis during Adaptation of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* to 0.7 M NaCl. *J Bacteriol* Vol. 177: 3563–3572.
17. Blomberg A, Adler L. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 33:145-212.
18. Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG. 1995. Adaptations to Environmental Stresses. *The Plant Cell.* 7: 1099-1111.
19. Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC. 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259: 1760–1763.

20. Brown AD. 1990. Microbial water stress physiology: principles and perspectives. J. Wiley and Sons Ltd., Chichester, England.
21. Bunce GE. 1994. Evaluation of the impact of nutrition intervention on cataract prevalence in China. *Nutr Rev* 52: 99-101.
22. Burke RM , Jennings DH. 1990. Effect of sodium chloride on growth characteristics of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* in batch and continuous culture under carbon and potassium limitation. *Mycology Research* 94: 378-388.
23. Cabib E, Drgonova J, Drgon T. 1998. Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 67:307–333.
24. Castrejon F, Gomez A, Sanz M, Duran A, Roncero C. 2006.. The RIM101 Pathway Contributes to Yeast Cell Wall Assembly and Its Function Becomes Essential in the Absence of Mitogen-Activated Protein Kinase Slt2p. *Eukaryotic Cell.* 5: 507–517.
25. Castro D, Peña A, Ramírez J. 2006. Respuesta transcripcional de *Debaryomyces hansenii* al choque salino. Sociedad Mexicana de Bioquímica. XXVI Congreso Nacional. Guanajuato, México, 12 -17 de noviembre.
26. Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young, RA. 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell* 12:323-37.
27. Cerniglia CE, Crow SA. 1981. Metabolism of aromatic hydrocarbons by yeast. *Arch. Microbiol.* 129:9-13.
28. Chedekel MR , Smith SK, Post PW, Opoka A, Vessel DL. 1978. Photodestruction of pheomelanin: role of oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 5395-5399.
29. Cholet O, Hénaut A, Casaregola S, Bonnarme P. 2007. Gene expression and biochemical analysis of cheese-ripening yeasts: focus on catabolism of L-methionine, lactate, and lactose. *Appl Environ Microbiol.*73: 2561-70.

30. Couto da Silva Graça MM. 2004. Salt stress response of the extremely halotolerant yeast *Candida halophila* (syn *versatilis*) CBS 4019. Tesis (PhD). Universidad de Minho, Braga, Portugal.
31. Cruz JM, Dominguez JM, Dominguez H, Parajó JC. 2000. Xylitol production from barley bran hydrolysates by continuous fermentation with *Debaryomyces hansenii*. *Biotech. Lett.* 22: 1895 -1898.
32. Dalton HK, Board RG , Davenport RR. 1984. The yeasts of british sausage and minced beef. *Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol.* 50:227-248.
33. De Groot, PWJ, Ram AF, Klis FM. 2005. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genetics and Biology* 42:657-675.
34. de Nobel H, van Den Ende H, Klis FM. 2000. Cell wall maintenance in fungi. *Trends Microbiol.* 8: 344–345.
35. Dujon B. 1996. The yeast project: what did we learn. *Trends Genet* 7: 263-270.
36. Dujon B, Sherman D, Fischer G., Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neuveglise C , Talla E , Goffard N , Frangeul L , Aigle M , Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S , Blanchin S , Beckeric JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisrame A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, De Daruvar A , Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A , Koszul R , Lemaire M, Lesur I, Ma L., Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztas S , Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard G F, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekaia F, Wesolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyern M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P y Souciet JL. 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature* 430: 35-44.
37. Ericksson PH, Alipour L, Adler, Blomberg A. 2000. Rap1p-binding sites in the *Saccharomyces cerevisiae* GPD1 promoter are involved in its response to NaCl. *J Biol Chem* 275:29368–29376.
38. Estruch F. 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* 24:469-86.

39. Gadd GM, Edwards SW. 1986. Heavy metal induced flavin production by *Debaryomyces hansenii* and possible connections with iron metabolism. Br. Myco. Soc. 87:533-542.
40. Garcia R, Bermejo C, Grau C, Perez R, Rodriguez-Pena JM, Francois J, Nombela C, Arroyo J. 2004. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. J Biol Chem 279:15183-95.
41. García-Salcedo R, Casamayor A, Ruiz A, González A, Prista C, Loureiro-Dias MC, Ramos J, Ariño J. 2006. Heterologous Expression Implicates a GATA Factor in Regulation of Nitrogen Metabolic Genes and Iron Homeostasis in the Halotolerant Yeast *Debaryomyces hansenii*. Eukaryotic Cell Vol. 5: 1388-1398.
42. Gardner Eldon John, Simmons, Michael J. Snusted, Peter. 2007. Principios de genética. 4ta edición. Mexico: Limusa Wiley.
43. Garrett-Engele P, Moilanen B, Cyert MS. 1995. Calcineurin, the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. Mol. Cell. Biol. 15:4103–4114.
44. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, *et al.*... 1996. Life with 6000 genes. Science. 274:563-567.
45. Gonzalez-Hernandez JC y Pena A. 2002. Adaptation strategies of halophilic microorganisms and *Debaryomyces hansenii* (halophilic yeast). Rev Latinoam Microbiol 44:137-56.
46. Gonzalez-Hernandez JC, Jimenez-Estrada M, Pena A. 2005. Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress. Extremophiles 9:7-16.
47. Gori K, Mortensen HD, Arneborg N, Jespersen L. 2005. Expression of the GPD1 and GPP2 orthologues and glycerol retention during growth of *Debaryomyces hansenii* at high NaCl concentrations. Yeast 22:1213-22.

48. Govind NS, McNally KL, Trench RK. 1992. Isolation and sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene from the euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii*. *Curr Genet* 22:191-5.
49. Grigull J, Mnaimneh S, Pootoolal J, Robinson MD, Hughes TR. 2004. Genome-wide analysis of mRNA stability using transcription inhibitors and microarrays reveals posttranscriptional control of ribosome biogenesis factors. *Mol Cell Biol* 24:5534-47.
50. Guerrero CA, Aranda C, Deluna A, Filetici P, Riego L, Anaya VH, Gonzalez A. 2005. Salt-dependent expression of ammonium assimilation genes in the halotolerant yeast, *Debaryomyces hansenii*. *Curr Genet* 47:163-71.
51. Guerrero-Olazarán M, Cab-Barrera E, Galán-Wong LJ, Viader-Salvadó JM. 2004. Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la aplicación en acuicultura. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola 16-19 Noviembre, Hermosillo, Sonora, Mexico.
52. Gustafsson L, Norkrans B. 1976. On the mechanism of salt tolerance. Production of glycerol and heat during growth of *Debaryomyces hansenii*. *Arch Microbiol* 110:177-83.
53. Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, Davenport K. 1998. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1264-1300.
54. Guy CL. 1990. Cold Acclimation and Freezing Stress Tolerance: Role of Protein Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41:187-223.
55. Haro R, Garciadeblas B, Rodriguez-Navarro A. 1991. A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS* 291:189-191.
56. Hasegawa P, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* Vol. 51:463-499.
57. Herskowitz I. 1995. MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* 80:187-197.

58. Hirasawa T, Nakakura Y, Yoshikawa K, Ashitani K, Nagahisa K, Furusawa C, Katakura Y, Shimizu H, Shioya S. 2006. Comparative analysis of transcriptional responses to saline stress in the laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae* with DNA microarray. *Appl Microbiol Biotechnol* 70:346-57.
59. Hohmann S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:300-72.
60. Jelinsky SA, Samson LD. 1999. Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1486-91.
61. Keyse SM. 2000. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* 12:186-92.
62. Kim KY, Park SW, Chung YS, Chung CH, Kim JI, Lee JH. 2004. Molecular cloning of low-temperature-inducible ribosomal proteins from soybean. *J Exp Bot* 55:1153-5.
63. Kultz D, Burg M. 1998. Evolution of osmotic stress signaling via MAP kinase cascades. *J Exp Biol* 201:3015-21.
64. Lagos López FM. 1999. Tesis doctoral- Levaduras autóctonas aisladas en vinos de la comarca de Laujar de Andarax (Almería). Su influencia en la calidad. Editorial de la Universidad de Granada.
65. Larsson C, Morales C, Gustafsson L, Adler L. 1990. Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *J Bacteriol* 172:1769-74.
66. Larsson K, Eriksson P, Ansell R, Adler L. 1993. A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 10: 1101–1111.
67. Lepingle A, Casaregola S, Neugeglise C. *et al....* 2000. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 14. *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*. *FEBS Lett* 487:82-86.

68. Mager WH, Varela JC. 1993. Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. *Mol Microbiol* 10:253–258.
69. Marquez JA, Serrano R. 1996. Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENAI* during salt stress in yeast. *FEBS Lett.* 382:89–92.
70. Mewes HW, Albermann K, Bahr M, Frishmann D, Gleissner J, Hani, Heumann K, Kleine K, Maier A, Oliver SG, Pfeifer F, Zollner A. 1997. Overview of the yeast genome. *Nature* 387: 7-9.
71. Montiel V, Ramos J. 2007. Intracellular Na and K distribution in *Debaryomyces hansenii*. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of DhNHX1. *FEMS Yeast Res* 7:102-9.
72. Morsomme P, Slayman CW, Goffeau A. 2000. Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1469:133–157.
73. Nikishimi M, Machline LJ. 1975. Oxidation of alpha-tocopherol model compound by superoxide anion. *Arch. Biochem. Biophys.* 170: 864-869.
74. Norkrans B. 1966. Studies on marine occurring yeasts: Growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Archiv. Fur Mikrobiologie* 54:374-392.
75. Norkrans B. 1968. Studies on marine occurring yeasts: respiration, fermentation and salt tolerance. *Arch Microbiol* 62:358-372.
76. Norkrans B, Kylin A. 1969. Regulation of the potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeasts. *J. Bacteriol.*100(2):836-845.
77. Norbeck J, Blomberg A. 1998. Amino acid uptake is strongly affected during exponential growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 0.7 M NaCl medium. *FEMS Microbiol Lett.* 158:121-6.
78. Oren A. 2003. Halophilic Microorganisms and their Environments. Kluwer Academic Publishers New York. Chapters 1-20.

79. Pesti M, Novák R. 1984. Decreased permeability of glycerol in an ergosterol-less mutant of *Candida albicans*. *Acta Microbiologica Hungarica* 31:81-84.
80. Pitteta V, Conzelmann A. 2007. Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. 1771(3):405-20.
81. Pontón J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la Anidulafungina *Rev Iberoam Micol* 25: 78-82.
82. Posas F, Chambers JR, Heyman JA, Hoeffler JP, Nadal E y Ariño J. 2000. The Transcriptional Response of Yeast to Saline Stress. *J Biol Chem* 275:17249-17255.
83. Posas F, Saito H. 1997. Osmotic activation of the HOG MAP kinase pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* 276:1702–1705.
84. Prista C, Almagro A, Loureiro-Dias MC y Ramos J. 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl Environ Microbiol* 63:4005-9.
85. Prista C, Gonzalez-Hernandez JC, Ramos J y Loureiro-Dias MC. 2007. Cloning and characterization of two K<sup>+</sup> transporters of *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology* 153: 3034-43.
86. Prista C, Loureiro-Dias MC, Montiel V, Garcia R y Ramos J. 2005. Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* 5:693-701.
87. Proft M y Serrano R. 1999. Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated ENA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol Cell Biol* 19:537-46.
88. Rep M, Albertyn J, Thevelein JM, Prior BA y Hohmann S. 1999. Different signalling pathways contribute to the control of GPD1 gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 145 (3):715-27.



89. Rep M, Krantz M, Thevelein JM, Hohmann S. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem* 275:8290-300.
90. Rothstein RJ, Bristol LA, Hosier B, Brown RH, Kunel RW. 1994. Chronic inhibition of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4155-4159.
91. Seda-Miró JM, Arroyo-González N, Pérez-Matos A, Govind NS. 2007. Impairment of cobalt-induced riboflavin biosynthesis in a *Debaryomyces hansenii* mutant. *Can J of Microb*, 53 (11):1272-1277.
92. Serrano R. 1980. Effect of ATPase Inhibitors on the Proton Pump of Respiratory-Deficient Yeast. *Eur J Biochem* 105: 419 - 424.
93. Serrano R, Mulet JM, Rios G, Marquez JA, de Larrinoa IF, Leube MP, Mendizabal I, Pascual A, Proft M, Ros R, Montesinos C. 1999. A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J. Exp. Bot.* 50:1023–1036.
94. Slaninová I, Sesták S, Svoboda A, Farkas V. 2000. Cell wall and cytoskeleton reorganization as the response to hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology* 173:245-252.
95. Smyth GK, Speed TP. 2003. Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 31: 265-273.
96. Smyth GK. 2004. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 3(1) Article 3.
97. Smyth GK. 2005. Limma: linear models for microarray data. In: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber (eds.), Springer, New York, 397-420.

98. Staab JF, Ferrer CA, Sundstrom P. 1996. Developmental Expression of a Tandemly Repeated, Proline-and Glutamine-rich Amino Acid Motif on Hyphal Surfaces of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 271:6298-6305.
99. Thomashow MF. 1998. Role of Cold-Responsive Genes in Plant Freezing Tolerance. *Plant Physiol.* 118: 1–7.
100. Thomé PE. 2004. Isolation of a GPD gene from *Debaryomyces hansenii* encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>). *Yeast* 21:119-26.
101. Thomé PE. 2005. Heterologous expression of glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene [DhGPD1] from the osmotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Microbiol* 51:87-90.
102. Thomé PE. 2007. Cell wall involvement in the glycerol response to high osmolarity in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91:229-35.
103. Thomé PE, Trench RK. 1999. Osmoregulation and the Genetic Induction of Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase by NaCl in the Euryhaline Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Mar Biotechnol (NY)* 1: 230-238.
104. Vaupotič T, Plemenitaš A. 2007. Differential gene expression and Hog1 interaction with osmoresponsive genes in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. *BMC Genomics* 8:280.
105. Velkova K, Sychrova H. 2006. The *Debaryomyces hansenii* NHA1 gene encodes a plasma membrane alkali-metal-cation antiporter with broad substrate specificity. *Gene* 369:27-34.
106. Ventosa A, Gutierrez MC, Kamekura M, Zvyagintseva IS, Oren A. 2004. Taxonomic study of *Halorubrum distributum* and proposal of *Halorubrum terrestre* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:389-92.
107. Warner JR. 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* 24(11):437-40.

108. Winkler A, 2002. The function of trehalose biosynthesis in plants. *Phytochemistry*. 60(5):437-40.

109. Yale J, Bohnert HJ. 2001. Transcript Expression in *Saccharomyces cerevisiae* at High Salinity. *J Biol Chem* 276:15996-16007.

## APÉNDICE A

**Tabla 1. Genes de *D. hansenii* CBS767 que incrementaron su expresión después de la exposición a NaCl 2M.**

Número de acceso al GeneBank	Características del Gen	Estadística “t”			Cambio en el Nivel de Expresión (No. Veces)		
		30 min	3.0 H	6.0 h	30 min	3.0 h	6.0 h
XM_456843.1	Similar a sp Q00673 NADH-ubiquinona oxido probable reductasa de <i>Candida maltosa</i>	0.36	5.16	9.08	1.02	1.35	1.70
XM_456903.1	Altamente similar a CaRPL16A proteína ribosomal de <i>Candida albicans</i>	3.32	5.67	7.85	1.88	2.94	4.44
XM_457168.1	Similar a CaCOX13 cadena de citocromo-c oxidasa de <i>Candida albicans</i>	3.61	3.29	8.69	1.29	1.26	1.84
XM_457834.1	Similar a B42CA0854 IPF8854 de <i>Candida albicans</i>	-0.29	6.05	8.87	1.05	2.92	4.80
XM_457965.1	Altamente similar a YOR065w CYT1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.88	5.5	8.51	1.17	1.60	2.06
XM_458083.1	Ninguna similaridad	5.2	4.48	6.63	1.45	1.37	1.60
XM_458234.1	Altamente similar a YJR048w CYC1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4.63	4.36	7.8	1.96	1.89	3.11
XM_458595.1	Altamente similar a ubiquinona oxidoreductasa subunidad NUIM de	1.96	4.43	8.5	1.12	1.29	1.63

<i>Candida albicans</i> IPF14389							
XM_459262.1	Altamente similar a CaPOL30 de <i>Candida albicans</i>	1.77	5.52	9.37	1.11	1.39	1.76
XM_459431.1	Altamente similar a CaACO1 aconitato hidratasa de <i>Candida albicans</i>	3.79	5.6	8.48	1.50	1.82	2.48
XM_460298.1	Altamente similar a CaRPL24A proteína ribosomal de <i>Candida albicans</i>	3.05	6.19	7.83	1.61	2.63	3.39
XM_460408.1	Altamente similar a Mannosa-1-fosfatasa guaniltransferasa de <i>Candida albicans</i>	3.5	4.91	9.88	1.39	1.58	2.52
XM_460573.1	Altamente similar a CaPMT2 O-D- manosiltransferasa de <i>Candida albicans</i>	2.27	5.01	7.87	1.11	1.27	1.46
XM_460602.1	Altamente similar a <i>Candida albicans</i> IPF8000	-0.37	5.86	8.28	1.02	1.40	1.61
XM_460718.1	Altamente similar a CaRPL17B RPL17B proteína ribosomal de <i>Candida albicans</i>	3.32	6.04	6.62	1.98	3.46	3.89
XM_460786.1	Altamente similar a CaPRT1 Factor de iniciación de traducción de <i>Candida albicans</i>	1.55	4.48	8.57	1.09	1.28	1.61
XM_460805.1	Similar a NUCM precursor de proteína de <i>Yarrowia lipolítica</i>	0.41	6.17	7.21	1.03	1.67	1.82
XM_461247.1	Alguna similaridad con <i>Candida albicans</i> IPF165	2.85	3.67	8.87	1.19	1.25	1.72

XM_461313.1	Altamente similar a CaRPS18 proteína ribosomal de <i>Candida albicans</i>	3.63	5.75	6.83	2.03	3.06	3.78
XM_461774.1	Similar a <i>Candida albicans</i> IPF7840 y similar a Pet123p proteína ribosomal, mitocondrial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.92	5.8	8.78	1.16	1.34	1.56
XM_461976.1	Similar a 40S proteína ribosomal S9, precursor mitocondrial de <i>Candida albicans</i>	3.12	3.06	8.71	1.21	1.20	1.70
XM_462382.1	Altamente similar a <i>Candida albicans</i> IPF11123	3.35	4.84	9.09	1.33	1.51	2.15
XM_462446.1	Similar a <i>Candida albicans</i> IPF9711	1.97	4.17	8.72	1.14	1.32	1.79
XM_456741.1	Altamente similar a la proteína ribosomal 40S (Omnipotent suppressor protein SUP44) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.8	7.21	5.66	1.88	5.06	3.57
XM_457044.1	Altamente similar a YOR063w TCM1 60S subunidad grande de una proteína ribosomal de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.96	9.73	6.39	1.16	4.57	2.71
XM_457613.1	(ninguna anotación)	3.51	9.36	6.11	1.89	5.46	3.03
XM_459049.1	Altamente similar a CaLYS22 de <i>Candida albicans</i>	-1.3	7.88	5.21	1.09	1.69	1.42
XM_459167.1	Similar a <i>Candida albicans</i> CaMNT1 Manosiltransferasa	1.41	6.77	6.5	1.12	1.71	1.67
XM_459914.1	Similar a <i>Candida albicans</i> CaRPL37B proteína ribosomal	1.94	7.52	6.41	1.35	3.22	2.71

XM_460673.1	Altamente similar a <i>Candida albicans</i> CaLYS4 homoaconitato hidratasa	0.9	7.96	5.11	1.09	2.19	1.66
XM_461877.1	Altamente similar a <i>Candida albicans</i> IPF7366 Arginil-tARN sintetasa	1.34	8.13	6.19	1.07	1.54	1.39
XM_456483.1	Altamente similar a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBR025c GTP-proteína de enlace	2.61	9.7	8.35	1.22	2.11	1.90
XM_456635.1	Similar a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLR325c RPL38 60S subunidad grande de proteína ribosomal	3.36	8.41	11	1.38	2.23	2.86
XM_456734.1	Altamente similar a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YOR096w RP30 proteína ribosomal	3.35	12.25	14.08	1.39	3.36	4.03
XM_456819.1	Similar a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YHL015w URP2 proteína ribosomal	1.95	10.59	11.09	1.22	2.91	3.06
XM_457175.1	Altamente similar a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBR189w SUP46 proteína ribosomal	5.41	12.02	16.05	1.55	2.66	3.70
XM_457609.1	Altamente similar a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLL045c RPL4B 60s subunidad grande proteína ribosomal	2.12	6.8	6.86	1.32	2.45	2.47
XM_457757.1	Altamente similar a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLR075w 60S subunidad grande proteína ribosomal	1.3	9.03	8.85	1.09	1.87	1.84
XM_457790.1	<i>Debaryomyces hansenii</i> ATPase ENA1p	-1.31	12.54	9.36	1.14	3.45	2.52

XM_458024.1	Similar a sp Q02753 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBR191w URP1A	3.14	6.59	7.37	1.87	3.70	4.33
XM_458290.1	Altamente similar a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YKR042w UTH1	1.47	6.67	6.75	1.21	2.35	2.37
XM_458566.1	Altamente similar a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGL076c RPL6A 60S subunidad grande proteína ribosomal	2.87	6.55	6.99	1.68	3.28	3.56
XM_458883.1	Similar a <i>Candida albicans</i> Descarboxilasa de Ornitina	4.09	11.93	9.36	1.48	3.11	2.44
XM_458989.1	Altamente similar a <i>Candida albicans</i> CaRPL81	2.34	11.11	11.75	1.26	3.03	3.24
XM_459092.1	Altamente similar a <i>Candida albicans</i> CaILV3	-0.48	8.64	9.84	1.03	1.68	1.81
XM_459257.1	Débilmente similar a <i>Candida albicans</i> 5184 IPF11090	2.64	6.43	9.69	1.17	1.47	1.79
XM_459635.1	Altamente similar a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SDH1 precursor de Flavoproteína, subunidad de succinato deshidrogenasa	3.84	10.19	14.55	1.33	2.12	2.92
XM_460297.1	Altamente similar a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGL030w RPL32 60S subunidad grande de una proteína ribosomal	4.59	6.72	7.31	2.47	3.76	4.22
XM_460509.1	Altamente similar a <i>Candida albicans</i> CaRPS4A proteína ribosomal S4	3.61	8.62	7.99	1.76	3.83	3.48
XM_461011.1	Altamente similar a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YMR121c RPL13B 60S subunidad grande de una	2.75	12.34	9.01	1.25	2.70	2.06



	proteína ribosomal						
XM_461310.1	Altamente similar a <i>Candida albicans</i> RPL10E proteína ribosomal	2.73	10.42	8.12	1.45	4.18	3.05
XM_461493.1	Altamente similar a <i>Candida albicans</i> ADE4 amidofosforibosiltransferasa	1.65	7.89	9.47	1.09	1.49	1.62
XM_461707.1	Altamente similar a <i>Candida albicans</i> CaRPS24 proteína ribosomal S24.e	3.53	8.46	6.71	1.60	3.11	2.46
XM_461869.1	Altamente similar a <i>Candida albicans</i> CaRPS4A proteína ribosomal S4	3.5	8.71	8.35	1.67	3.61	3.42
XM_462135.1	Altamente similar a <i>Candida albicans</i> CaRPL19A	3.68	6.12	7.15	1.86	2.80	3.34
XM_462215.1	Altamente similar a <i>Neurospora crassa</i> NCU07830.1 40S proteína ribosomal S14	3.98	8.75	8.98	1.55	2.61	2.68
XM_462243.1	Altamente similar a <i>Candida albicans</i> Ubiquitina proteína de fusion	3.66	7.91	7.44	1.50	2.39	2.27
XM_457182.1	Similar a <i>Candida albicans</i> CaSTL1 transportador de azúcar	8.62	3.79	0.77	3.08	1.64	1.10
XM_459544.1	Altamente similar a <i>Candida albicans</i> CARHR2 DL-glycerol fosfatasa	11.36	6.44	1.2	11.2	3.94	1.29
XM_457484.1	Altamente similar a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR077c MIR1 proteína de transporte de fosfato, mitocondrial	6.18	4.81	9.62	1.93	1.67	2.78
XM_457899.1	Altamente similar a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YER117w RPL17B proteína	6.77	12.49	16.75	1.72	2.73	3.85

	ribosomal						
XM_458832.1	Altamente similar a <i>Candida albicans</i> 60S proteína ribosomal L13	6.1	9.58	12.84	1.79	2.50	3.42
XM_459840.1	Altamente similar a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBL030c AAC2 ADP/ATP proteína acarreadora	7.69	18.66	16.02	1.55	2.91	2.51
XM_461164.1	Altamente similar a <i>Candida albicans</i> CaRPS25B y a <i>S. cerevisiae</i> RPS31B 40S proteína ribosomal	8.26	13.72	21.79	1.56	2.08	3.20
XM_462314.1	alguna similaridad con la proteína de la pared celular de la hifa de <i>C. albicans</i>	6.88	13.62	7.85	2.97	8.62	3.46

Los números de acceso y las anotaciones fueron exportados del GenBank. Los nombres de los genes y sus funciones se asignaron en base a su homología con genes de otras levaduras. La estadística T se generó de las estadísticas eBayes para cada gen. El cambio en el nivel de expresión también fue incluido.

APÉNDICE B

**Tabla 2. Genes de *D. hansenii* CBS767 que disminuyeron su expresión después de la exposición a NaCl 2M.**

Número de acceso al GeneBank	Características del Gen	Estadística “t”			Cambio en el Nivel de Expresión (No. Veces)		
		30 min	3.0 h	6.0 h	30 min	3.0 h	6.0 h
XM_457449.1	Similar a YPL057c SUR1 requerida para manosilacion de esfingolípidos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-8.91	-6.51	-6.28	1.82	1.55	1.53
XM_457594.1	Algunas similitudes con YDL035c GPR1 G- receptor de proteínas de <i>S.cerevisiae</i>	-5.51	-7.71	-6.06	1.60	1.93	1.68
XM_457863.1	Ninguna similitud	-6.58	-5.61	-8.36	1.45	1.37	1.60
XM_458256.1	Alguna similitud con CA1242 de <i>Candida albicans</i>	-9.1	-5.63	-8.39	2.51	1.77	2.33
XM_458531.1	Similar a CaFRE7 reductasa de hierro de <i>Candida albicans</i>	-7.84	-8.27	-10.26	1.63	1.67	1.90
XM_458615.1	Similar a <i>Candida albicans</i> IPF10270	-6.83	-9.27	-8.62	1.92	2.42	2.28
XM_459376.1	Similar a transportador de glucosa de <i>Candida albicans</i>	-9.48	-9.78	-11.21	2.92	3.02	3.55
XM_460241.1	Débilmente similar a <i>Candida albicans</i> IPF10922	-8.32	-7.58	-10.16	2.75	2.51	3.44
XM_461420.1	Similar a IPF885 β-1,3-D-glucano sintetasa de <i>C. albicans</i>	-7.52	-9.11	-16.29	2.03	2.35	4.63

XM_456662.1	Débilmente similar a 37 kDa proteína de la superficie celular de <i>Candida albicans</i>	-7.85	-2.31	-12.99	1.79	1.19	2.62
XM_457384.1	Débilmente similar a YDR169c STB3 SIN3 proteína de enlace de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-6.3	-5.13	-6.6	1.84	1.64	1.90
XM_459924.1	Similar a CaPHO84 fosfato inorganico/H simporter de <i>Candida albicans</i>	-15.73	1.96	1.87	6.64	1.26	1.25
XM_462468.1	Altamente similar a CaVTC4, asociado a la vacuola de <i>Candida albicans</i>	-12.35	0.49	5.12	1.85	1.02	1.29
XM_456429.1	Similar a CHA12 serina/L-treonina deaminasa de <i>Candida albicans</i>	0.39	-8.06	-7.32	1.05	2.96	2.68
XM_457709.1	Débilmente similar a YALIOE34045g de <i>Yarrowia lipolytica</i>	0.07	-7.62	-8.5	1.00	1.53	1.60
XM_457870.1	Débilmente similar a CA2903 IPF11725 de <i>Candida albicans</i>	-3.11	-11.01	-16.66	1.22	2	2.85
XM_459109.1	Similar a CaATH1 Trealasa ácida , vacuolar de <i>Candida albicans</i>	-4.93	-6.33	-6.45	1.6	1.89	1.91
XM_459348.1	Débilmente similar a YALIOE34045g de <i>Yarrowia lipolytica</i>	0.05	-7.44	-9.03	1.00	1.84	2.10
XM_460152.1	Ninguna homología	-3.52	-7.05	-7.33	1.40	1.96	2.01
XM_461533.1	Ninguna similaridad	-2.82	-6.6	-10.13	1.45	2.38	3.80
XM_462395.1	Similar a <i>Candida albicans</i> IPF16253	-2.31	-8.96	-11.55	1.29	2.64	3.50
XM_458199.1	Altamente similar a YJL001w PRE3 de	4.61	-8.25	-0.06	1.30	1.60	1.00

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>							
XM_461014.1	Similar a alpha-1,4-glucano glucosidasa de <i>Candida albicans</i>	3.19	-6.95	-5.67	1.29	1.74	1.57
XM_456597.1	Similar a spP05150 YJL088w ARG3 ornitina carbamoltransferasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-4.12	-2.48	-8.52	1.22	1.13	1.51
XM_456744.1	Similar a CA2718 IPF7374 de <i>Candida albicans</i>	-4.05	-5.94	-8.93	1.38	1.60	2.04
XM_456772.1	Similar a YBR287w de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y similaridad con una proteína de <i>S. pombe</i>	-5.68	-4.37	-8.39	1.66	1.48	2.11
XM_456974.1	Alguna similaridad con una proteína de <i>Kluyveromyces lactis</i> (KLLA0D00660g)	-3.71	-4.74	-7.71	1.20	1.26	1.46
XM_457508.1	Débilmente similar a YDR536w STL1 miembro de la familia de transporte de azúcares de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-4.57	-2.36	-12.38	1.33	1.16	2.17
XM_457839.1	Débilmente similar a YMR173w DDR48 proteína de shock térmico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.28	-3.37	-11.65	1.03	1.39	3.09
XM_457945.1	Altamente similar a CA5798 IPF4181 de <i>Candida albicans</i>	-6.12	-3.25	-6.72	1.94	1.42	2.07
XM_457952.1	Similar a YFL014w HSP12 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.02	-4.25	-10.38	1.00	1.75	3.94
XM_457996.1	Similar a CA0982 IPF7397 de <i>Candida albicans</i>	-0.19	3.02	-9.89	1.01	1.19	1.79
XM_458261.1	Alguna similaridad con CA5526 IPF2857 de	-0.79	-5.39	-13.02	1.07	1.59	3.08

<i>Candida albicans</i>							
XM_458481.1	Alguna similitud con KHR (killer toxin) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-3.9	-4.19	-8.35	1.22	1.24	1.53
XM_458896.1	Similar a CaAUT1 de <i>Candida albicans</i>	-1.51	-5.1	-10.68	1.10	1.37	1.95
XM_459527.1	Similar a CaPLB3 fosfolipasa B de <i>Candida albicans</i>	-4.29	-5.05	-6.94	1.57	1.70	2.08
XM_459598.1	Alguna similitud con proteína HAC1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-3.83	-6.01	-7.96	1.56	2.02	2.54
XM_459658.1	Débilmente similar a YDR313c PIB1 fosfatidil inositol (3)-asociado a función vacuolar de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.99	-5.83	-10.11	1.05	1.36	1.71
XM_459743.1	Similar a <i>Candida albicans</i> IPF2280, función desconocida	-4.34	-4.88	-13.35	1.30	1.35	2.25
XM_459751.1	Similar a dominio de cinc, factor de transcripción de <i>Candida albicans</i>	-4.61	-4.26	-7.52	2.08	1.96	3.29
XM_460109.1	Ninguna homología	-5.67	-4.23	-16.13	1.56	1.39	3.51
XM_461954.1	Similar a Aldehído deshidrogenasa de <i>Candida albicans</i> IPF1401	-2.69	-6.35	-6.62	1.26	1.72	1.76
XM_462398.1	Similar a <i>Candida albicans</i> IPF14603	-3.82	-4.58	-8.28	1.34	1.42	1.88
XM_462586.1	Similar a <i>Candida albicans</i> IPF12084	-1.9	-5.23	-7.66	1.20	1.65	2.09

Los números de acceso y las anotaciones fueron exportados del GenBank. Los nombres de los genes y sus funciones se asignaron en base a su homología con genes de otras levaduras. La estadística T se generó de las estadísticas eBayes para cada gen. El cambio en el nivel de expresión también fue incluido.

## RESUMEN CURRICULAR

**Nancy Arroyo González**

**Candidato para el Grado de  
Doctor en Ciencias con Especialidad en Biotecnología**

**Tesis: PERFIL DE EXPRESIÓN DEL GENOMA DE *Debaryomyces hansenii* EN  
RESPUESTA A LA OSMOADAPTACIÓN**

**Campo de Estudio:** Biología Molecular

**Datos Personales:** Nacida en Santurce, Puerto Rico el 10 de noviembre del 1953 a Don Victor Arroyo y Doña Hilda González.

### **Educación:**

M.S. Ciencia	2000
Universidad de Puerto Rico, Mayagüez	
Virología y Biología Molecular	
Tecnóloga Médica	1981
Escuela de Tecnología Medica	Huron, Dakota del Sur
Certificada por la Sociedad de Patólogos Clínicos de USA	
B.S. Biología	1974
Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez	

### **Experiencia Profesional:**

Asistente de Investigación, Lab de Biología Molecular Marina, RUM	2003-2007
Especialista de Parvovirus, Lab de Virología, RUM	2001-2003
Asistente de Investigación, Lab de Virología, RUM	1999-2000
Asistente de Maestra, Inmunología, RUM	1997-1999
Tecnóloga Médica, Lab Clínico	1985-1995

### **Publicaciones:**

Arroyo Gonzalez N, Vazquez A, Ortiz Zuazaga HG, Sen A, Luna Olvera H, Peña de Ortiz S, Govind NS. 2009. Genome-wide expression profiling of the osmoadaptation response of *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* 26: 111–124.

Seda-Miró JM, Arroyo-González N, Pérez-Matos A, y Govind NS. 2007. Impairment of cobalt-induced riboflavin biosynthesis in a *Debaryomyces hansenii* mutant. *Can J of Microb*, 53 (11):1272-1277.

Research Article

# Genome-wide expression profiling of the osmoadaptation response of *Debaryomyces hansenii*

Nancy Arroyo Gonzalez<sup>1,4</sup>, Adriel Vázquez<sup>2</sup>, Humberto G. Ortiz Zuazaga<sup>3</sup>, Arup Sen<sup>5</sup>, Hugo Luna Olvera<sup>4</sup>, Sandra Peña de Ortiz<sup>2</sup> and N. S. Govind<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Marine Sciences, University of Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico

<sup>2</sup>Functional Genomics Research Center, Department of Biology, Rio Piedras Campus, PO Box 23360, San Juan, Puerto Rico 00931-3360

<sup>3</sup>High Performance Computing Facility, University of Puerto Rico Central Administration, San Juan, Puerto Rico

<sup>4</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México

<sup>5</sup>Sustainable AgroBiotech. LLC, PO Box 1665, Lajas, Puerto Rico 00667

\*Correspondence to:

N. S. Govind, Department of Marine Sciences, University of Puerto Rico, Mayagüez Campus, PO Box 9013, Mayagüez, Puerto Rico 00681.

E-mail: gnadathur@uprm.edu

## Abstract

The euryhaline marine yeast *Debaryomyces hansenii* is a model system for the study of processes related to osmoadaptation. In this study, microarray-based gene expression analyses of the entire genome of *D. hansenii* was used to study its response to osmotic stress. Differential gene expression, compared to control, was examined at three time points (0.5, 3 and 6 h) after exposure of *D. hansenii* cultures to high salt concentration. Among the 1.72% of genes showing statistically significant differences in expression, only 65 genes displayed at least three-fold increases in mRNA levels after treatment with 2 M NaCl. On the other hand, 44 genes showed three-fold repression. Upregulated as well as the downregulated genes were grouped into functional categories to identify biochemical processes possibly affected by osmotic stress and involved in osmoadaptation. The observation that only a limited number of genes are upregulated in *D. hansenii* in response to osmotic stress supports the notion that *D. hansenii* is pre-adapted to survive in extreme saline environments. In addition, since more than one-half of the upregulated genes encode for ribosomal proteins, it is possible that a translational gene regulatory mechanism plays a key role in *D. hansenii*'s osmoregulatory response. Validation studies for ENA1 and for hyphal wall/cell elongation protein genes, using real-time PCR, confirmed patterns of gene expression observed in our microarray experiments. To our knowledge, this study is the first of its kind in this organism and provides the foundation for future molecular studies assessing the significance of the genes identified here in *D. hansenii*'s osmoadaptation. Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords:** *Debaryomyces hansenii*; osmoadaptation; genome-wide; microarray; salt tolerance

Received: 18 July 2008

Accepted: 22 December 2008

## Introduction

*Debaryomyces hansenii*, a marine ascomycete yeast, is unicellular, uninucleate, haploid and easy to culture in the laboratory, making it an attractive model for gene expression studies (Govind *et al.*, 1992). This organism is able to grow in the presence of up to 24% w/v NaCl (Norkrans, 1966) and is the most tolerant when compared

to other yeasts such as *Saccharomyces*, *Pichia* and *Candida* (Adler, 1986; Larsson *et al.*, 1990; Norkrans, 1966).

The physiology and biochemistry of salt tolerance has been well studied in *D. hansenii* (Adler, 1986). Some of the previous studies have reported the accumulation of compatible osmolytes in the interior of the cell in response to high salt concentrations (Guerrero *et al.*, 2005; Gustafsson



and Norkrans, 1976; Thome, 2005; Thome and Trench, 1999). Other studies have dealt with ion transport (Norkrans, 1966), the physiological basis for the high salt tolerance (Prista *et al.*, 1997) and the role of the cell wall in the response to high salinity (Thome, 2007).

Little is known about the genes involved in pathways that may be involved in osmoadaptation and very few genes have been isolated (Prista *et al.*, 2005). Genes homologous to *S. cerevisiae* HOG1 (mitogen-activated protein kinase) (Bansal and Mondal, 2000) and PBS2 (MAP kinase kinase) (Bansal *et al.*, 2001) were isolated from *D. hansenii* by phenotypic complementation in *S. cerevisiae*. Similarly, a gene homologous to *GPD1* (NAD<sup>+</sup> glycerol 3-phosphate dehydrogenase) was also isolated from *D. hansenii* by the same technique (Thome, 2004). However, the function of these genes in *D. hansenii* has not been elucidated, due to the lack of mutants.

The availability of the complete genome sequence of *D. hansenii* (Dujon *et al.*, 2004) has made a comprehensive search for genes that respond to osmotic stress a reality. In this study, we present a global analysis of the differential gene expression response of *D. hansenii* to osmotic stress, utilizing genome-wide expression array. The results of this study demonstrate that of the 6320 genes tested in the microarray, only 109, including previously unreported and unidentified ones, were differentially expressed in *D. hansenii* in the presence of 2 M NaCl.

## Materials and methods

### Yeast strains and growth conditions

The strain used in this study was *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* (CBS 767), obtained from the Collection de Levures d'Intérêt Biotechnologique (Thiverval-Grignon, France). The cells were grown as batch cultures in YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) to an early log phase ( $A_{600} = 8.0\text{--}9.0$ ) at 30 °C and shaken at 200–250 r.p.m. An aliquot of cells was collected for the time 0 (control), flash-frozen and maintained at –80 °C until RNA preparation. Osmotic stress was applied by addition of 2 M NaCl, after which samples were taken at 30 min, 3 h or 6 h. The cells were collected by centrifugation for 5 min at 5000 r.p.m., flash-frozen and stored at –80 °C.

### Probe and gene expression microarray design

Whole genome mRNA sequences from *D. hansenii* were downloaded in FASTA format from GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov>) and saved into a text file. Sequences in text format were downloaded to the eArray web design application from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) for probe design. Two probes per target were designed in the sense orientation with a 3' bias, using base composition methodology as recommended by the manufacturer for gene expression arrays. Using comparative genomics, probes were aligned to other yeast sequences and were classified according to their similarities: highly similar, similar, some similarities, weakly similar and no similarities, all based on sequence homologies. Probes were tested for self-complementarities, specificity and cross-reactivity. The best probes were used for generating a custom microarray arranged in an 8 × 15 K format, using a randomized lay-out. Each array included 12 640 probes (6320 genes, each gene with two probes), 60 bp in length, 459 positive (spike-in) controls and 77 negative control probes distributed across the array. Positive controls were used as a quality control of the cRNA synthesis, labelling and hybridization steps, whereas negative controls were included to estimate fluorescence background and background variance.

### Total RNA extraction

Total RNA was isolated as described in the RNeasy Mini Kit protocol from Qiagen (CA, USA). RNA concentration and integrity were detected using an Agilent 2100 Bioanalyser with an RNA 6000 Nano LabChip<sup>®</sup> kit. Confirmatory readings were performed using an ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Rockland, DE, USA).

### Synthesis and purification of fluorescent cRNA

Total RNA from control or experimental samples was linearly amplified and labelling using two different fluorescent dyes: cyanine 3-CTP (Cy-3), and cyanine 5-CTP (Cy-5; Amersham Biosciences, UK), as described in the Agilent Low RNA Input Linear Amplification Kit. Briefly, in a first step, double-stranded cDNA (dscDNA) was generated using the Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT). In the first reaction,

1 µg total RNA was mixed with T7 promoter primers and the diluted spike-in mix (A or B), incubated at 65 °C during 10 min and placed on ice for 5 min. The denatured primers and total RNA were mixed with the following reagents: 5× First Strand Buffer, 0.1 M DTT, 10 mM dNTP mix, MMLV-RT and RNaseOUT. This reaction mix was incubated at 40 °C for 2 h, then at 65 °C for 15 min, and finally placed on ice for 5 min. Next, synthesis and labelling of cRNA was performed simultaneously, mixing the prepared reaction (containing the dsDNA) with a transcription master mix (4× transcription buffer, 0.1 M DTT, NTP mix, 50% PEG, RNaseOUT, inorganic pyrophosphatase, T7 RNA polymerase and Cy-3 or Cy-5; 10 mM each). The reaction was incubated at 40 °C for 2 h. Amplified fluorescent cRNA probes were purified using the Qiagen's RNeasy mini-spin columns. Finally, fluorescently labelling cRNA samples were analysed for yield and dye incorporation using the ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies). Only samples that presented a concentration of >8 pm/mg (a measure representing efficient dye incorporation) were used for hybridization, as recommended by the manufacturer.

### Hybridization and washing protocol

The experimental design consisted of six microarray experiments. Cy-3 labelling cRNA control targets were combined with Cy-5 labelling cRNA experimental targets obtained from 0.5 h, 3 h and 6 h samples. The combined Cy-3 and Cy-5 cRNAs targets were used for probe hybridization onto the first, third, and fifth microarray, respectively. Dye swapping was done using different biological replicates for both Cy-5 labelling control targets and the Cy-3 experimental targets (as above) and used for hybridization on the second, fourth and the sixth microarray, respectively. Dye swaps using different biological replicates were done to correct for any dye-bias. The hybridization and washing protocols were done as recommended by the manufacturer (Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol, version 5.5, February 2007, from Agilent Technologies). Briefly, 300 ng Cy-3- and Cy-5-labelling cRNAs were combined with 10× blocking agent, and 25× fragmentation buffer at 60 °C for 30 min. The reaction was stopped with 2× GE hybridization buffer HI-RPM and

hybridized to the oligo microarray for 17 h at 60 °C with continuing rotation (10 r.p.m.). The reagents used for this step were from the Gene Expression Hybridization Kit. After hybridization, slides were washed for 1 min at room temperature, using GE wash solution 1, and 1 min at 37 °C with GE wash solution 2. Next, the slides were washed for 1 min with acetonitrile (Sigma). A final washing was done using a stabilization and drying solution for 30 s.

### Data processing and statistical analysis

Data images were obtained by laser-based scanning using a microarray scanner and feature extraction software (version 8.1), both from Agilent. Scanning parameters were as recommended by the manufacturer. Briefly, the resolution settings for scanning were 5 µm, using minimum (10%) and maximum (100%) photomultiplier tube detection sensitivities. An initial assessment of the array was performed using the information from the quality report extracted from the feature extraction software (version 8.1). Uniformity and reproducibility of the arrays and the correlation curves of the 'spike-ins' confirmed that no problems arose during the microarray procedures. Then, summarization of the two probes per gene on each array was done by computing the median intensity values of the two probes per gene. These data were used for further analyses. Analysis of the microarray data consisted of the following steps: (a) within-array and between-array normalization; (b) fitting the data to a linear model; and (c) computing differential gene expression. Normalization of the data was as previously described (Smyth and Speed, 2003). Briefly, in the 'within-array normalization' analyses, the *M*-values were normalized for each array separately, using a global loss method without background correction, whereas in the 'between-array normalization' analyses log-ratios were normalized to be comparable across arrays, using the aquantile method. Normalization success was determined using MA plot graphical representations. These MA-plots depict the log-ratio of red (*R*) vs. green (*G*) (the *M* value on the y axis) against the overall intensity of each spot (the *A* value on the x axis). The log-ratio is represented by the *M* value,  $M = \log_2(R) - \log_2(G)$  and the overall intensity by the *A* value,  $A = [\log_2(R) + \log_2(G)]/2$ . Then, the data were fitted to a linear model generating design and contrast matrices to estimate the *M*

values. RNA sources and main comparisons performed in the array were specified in the design and contrast matrices, respectively. In this experiment, RNA sources from different time points after salt exposure were included (at 0, 30 min, 3 h and 6 h). Dye swapping was done to correct for differences in the incorporation of the dyes. The main comparisons were done for each time point against the control sample (defined at 0 h after salt exposure). Then, the linear model computed a coefficient of expression corresponding to the  $\log_2$  ratios of the various comparisons.

Finally, to find genes with significant changes in expression among the groups, an empirical Bayes (eBayes) moderated statistic was applied to the data, as previously described (Smith *et al.*, 2004). Multiple test correction was applied to the  $p$  values computed by eBayes statistical analysis for adjustment of the false discovery rate to  $p < 0.05$ , using Benjamini and Hochberg's as well as nested F statistics. Significant genes were ranked according to the log odds factor (Bayes factor). The computed factor gives information related to the probability of a gene of being differentially expressed. All the procedures specified above were performed using LIMMA software from Bioconductor (Smyth, 2005). Gene annotation for each of the significant genes was obtained from GenBank. Significant genes showing similar gene expression patterns were grouped using the coefficient expression values obtained from the eBayes statistical analysis and exported to Sigma Plot software for graphical analysis. The microarray data described here follow the MIAME recommendations and have been deposited at the NCBI gene expression and hybridization array data repository (GEO: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under Accession No. GSE9911.

### Primer design for real-time PCR

Sequences of both the genes of interest (*ENAI*, Accession No. XM\_457790; *HWPI*, Accession No. XM\_462314 and *ACT1* (*actin*, used as a control), Accession No. XM\_45873) were obtained from Genbank. NetPrimer software program was used ([http://www.premierbiosoft.com/net\\_primer](http://www.premierbiosoft.com/net_primer)) to avoid possible hairpins, dimers and cross-dimers. A BLAST search was done on all primers to ensure that they would not potentially anneal to other targets. The following forward

and reverse primers were used: *ENAI*<sub>FORWARD</sub>, 5'-ATGGTGTGCGTTATTATTAG-3' ( $T_m = 52.08^\circ\text{C}$ ); *ENAI*<sub>REVERSE</sub>, 5'-CATTGTGTTTCGATTTTCG-3' ( $T_m = 50.5^\circ\text{C}$ ); *HWPI*<sub>FORWARD</sub>, 5'-GCCGGT-ACCACTCCAG-3' ( $T_m = 54.7^\circ\text{C}$ ); *HWPI*<sub>REVERSE</sub>, 5'-AGAAGTAGATTGAGC AGCA-3' ( $T_m = 51.2^\circ\text{C}$ ); *ACT1*<sub>FORWARD</sub>, 5'-GATTATGAAGTGT-GATGTC-3' ( $T_m = 52.4^\circ\text{C}$ ); and *ACT1*<sub>REVERSE</sub>, 5'-TTAGAAACACTTATGATGAAC-3' ( $T_m = 55.37^\circ\text{C}$ ). All primers were synthesized and HPLC-purified by Genomechix LLC (Gainesville, FL, USA).

### Real-time PCR experiments

Real-time PCR assays were performed for the *ENAI* and *HWPI* genes, as described in the *Methods and Application Guide*, © 2006 by Stratagene, using Brilliant<sup>®</sup> II QRT-PCR 1-Step Master Mix (Catalogue No. 600809) and the Mx3005P analyser, both from Stratagene (La Jolla, CA, USA). Experimental reactions were prepared in a 25  $\mu\text{l}$  final volume by combining the following components: 7.06  $\mu\text{l}$  nuclease-free PCR-grade  $\text{H}_2\text{O}$ ; 12.5  $\mu\text{l}$  2 $\times$  QRT-PCR master mix; 87.5  $\text{pM}/\mu\text{l}$  forward primer; 72.05  $\text{pM}/\mu\text{l}$  reverse primer (optimized concentration for *ENAI*); 0.375  $\mu\text{l}$  diluted reference dye; and 0.0625  $\mu\text{l}$  StrataScript RT/RNase block enzyme mixture 2. The reactions were mixed without creating bubbles and distributed within the 90-well plate designed for this analyser. 100 ng experimental RNA was added to each reaction and gently mixed. The reactions were placed in the Mx3005P analyser and run with the following RT-PCR cycling programme: 1 cycle for 30 min at 50  $^\circ\text{C}$ , 1 cycle for 10 min at 95  $^\circ\text{C}$ , 40 cycles for 30 s at 95  $^\circ\text{C}$ , annealing was for 1 min at 50  $^\circ\text{C}$  for *ENAI* (and 53  $^\circ\text{C}$  for *HWPI*) and 30 s at 72  $^\circ\text{C}$ , 1 cycle for 1 min at 95  $^\circ\text{C}$  and 1 cycle for 30 s at 55  $^\circ\text{C}$ . The same protocol was used for *HWPI* and *ACT1*, except that the corresponding primer concentrations were as follows: 56.88  $\text{pM}/\mu\text{l}$  forward primer and 59.89  $\text{pM}/\mu\text{l}$  reverse primer for *HWPI*, and 31.5  $\text{pM}/\mu\text{l}$  forward primer and 21.4  $\text{pM}/\mu\text{l}$  reverse primer for *ACT1*. A 'no template' control was also included among the reactions in order to detect the presence of artifacts, such as primer-dimers and amplification products due to mispriming. In addition, a 'no RT' control was included to detect potential amplification products originating from genomic DNA. Melting curve analysis was

performed to identify potential secondary products in the amplification reactions. Finally, amplification products were verified on agarose gels. The abundance of each gene was determined using the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method. For validation studies, we used three biological replicates (not used in the previously discussed microarray studies), each run in triplicate. One-way ANOVA of the relative gene expression values obtained from real-time validation studies was done using GraphPAD software (version 4).

## Results

### Differential gene expression in *D. hansenii* as a result of high salt exposure

Different strains of *D. hansenii* show different levels of osmotolerance (Govind *et al.*, unpublished data). A survival curve of *D. hansenii* CBS 767 (see Supporting information, Figure S2) in the presence of increasing concentrations of NaCl indicates that 2 M NaCl results in 40% survival of the organism and is at the upper threshold of survival for this strain of *D. hansenii*. These data indicated that this concentration represents osmotic stress. For these experiments, *D. hansenii* cultures were exposed to 2 M NaCl and were harvested at 30 min, 3 h or 6 h. Control cells were harvested without any prior treatment (termed time 0 control). The three time points were chosen based on Gori *et al.* (2005) (3 h) and Thome and Trench (1999) (0.5 h). We added a 6 h time to differentiate between transiently vs. stably induced genes. RNA was extracted from cells and used for analysis of differential gene expression with custom-designed oligonucleotide microarrays, as described in Materials and methods (the design of our experiment is depicted in Figure S1 of the Supporting information).

### Volcano plot analysis

Figure 1A shows representative results from the dual hybridizations using fluorescently labelling target cRNAs. Statistical analyses of the results was obtained from the eBayes-moderated *t*-test and multiple test corrections. Our results identified 109 significant genes, representing 1.72% out of the total 6320. Volcano plots were also produced to gain a perspective on global trends in

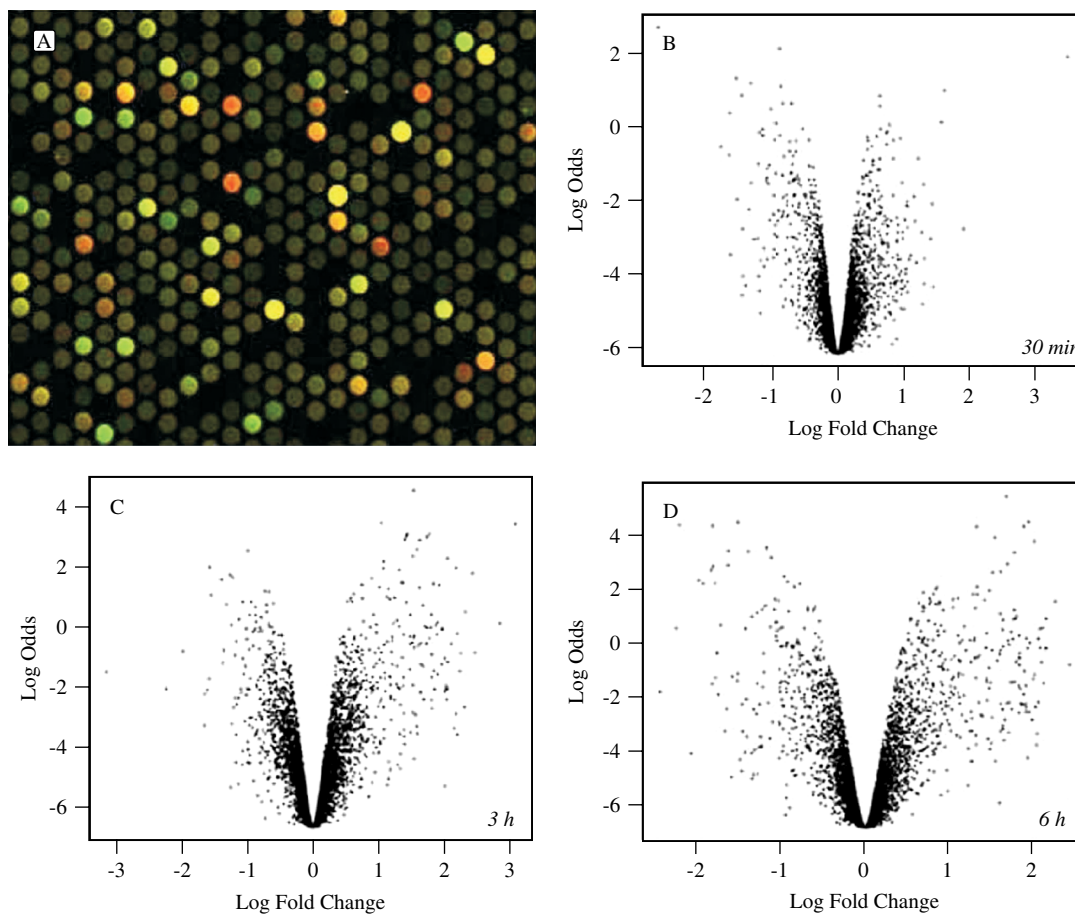
the data (Figure 1B–D). In these charts, odds from Bayesian statistics were plotted against the fold change both expressed as  $\log_2$  (log odds and log fold change, respectively). In these analyses, a gene is probably differentially expressed when it shows a trend toward positive log odds values. Results from the volcano plot analyses demonstrated significant genes at each time point: genes that showed positive log odds values with varying levels of fold changes. These results suggest a higher level of differential gene expression at 3 and 6 h compared to what is seen at the 30 min time point (Figure 1C, D vs. B).

### Venn diagram analysis

A general view of the expression changes throughout the different time points of the significant genes can be appreciated in the Venn diagram depicted in Figure 2A. Four genes were identified (3.67% of the total significant genes) that showed significant differential gene expression (either up- or down-regulated) exclusively at 30 min, 10 genes (9.17%) significantly differentially expressed exclusively at the 3 h time point, and 44 genes (40.37%) significantly differentially expressed at 6 h. In addition, gene expression overlap was observed across the three time points. Three genes identified (2.75%) that were significant at both 30 min and 6 h, 34 (31.19%) were significant at 3 and 6 h, and 14 (12.84%) genes were significantly differentially expressed at all time points. Notably, there were no genes that showed specific overlap with respect to differential gene expression between the 30 min and 3 h time points. A total of 6211 genes represented on the arrays were not differentially expressed. The Venn diagram (Figure 2A) and the volcano plot (Figure 1D) analyses showed that most of the genes were significantly differentially expressed at 6 h after treatment with 2 M NaCl.

### Bar and pie chart analyses for fold changes and functional classification

Figure 2B depicts the patterns of gene expression across time points in terms of fold changes. As seen in the bar graph, most of the significantly differentially expressed genes showed upregulation: 65/109 genes (59.6%) upregulated, whereas 44/109 genes were downregulated (40.4%), at least at one time point. From the 21 significant genes observed



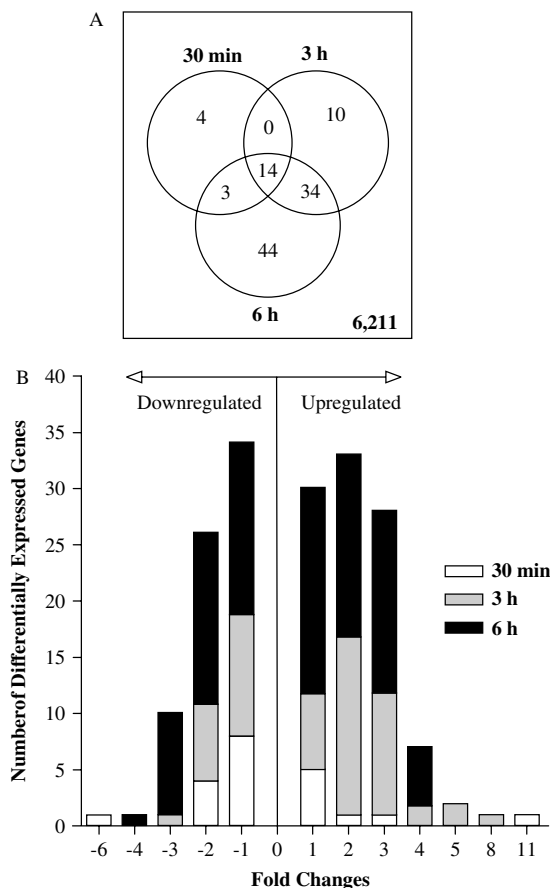
**Figure 1.** (A) Representative image from our dual hybridizations using fluorescently labelling target cRNAs. Volcano plots were generated from the Bayesian statistics to gain a perspective on global trends in the data at 30 min (B), 3 h (C) and 6 h (D) after high salt exposure. Results from the volcano plot analyses demonstrated significant genes at each time point: genes that showed positive log odds values with varying levels of fold changes. Higher levels of differential gene expression occurred at 3 and 6 h compared to what is seen at the 30 min time point

at 30 min (see the Venn diagram, Figure 2A), 8 (38.1%) were upregulated, whereas 13 (61.9%) were downregulated. In addition, 39 (67.24%) were upregulated at 3 h, whereas 19 (32.76%) were downregulated. Finally, 55/95 (57.89%) significant genes observed at 6 h presented an upregulation pattern, whereas 40 (42.11%) were downregulated at this time point. Overall, the number of up- or downregulated genes presented a steady tendency to increase across time. Moreover, we found an inverse interaction between up- and downregulation of the significant genes. Specifically, gene upregulation was lower at 30 min, when downregulation was higher. On the other hand, gene upregulation was higher at 3 and 6 h when the number of downregulated genes was lower. Importantly,

similar to the pattern observed in the Venn diagram, differential gene expression was higher at 6 h. Thus, volcano plot, Venn, and bar plotting analysis provided congruent information about the profile and tendencies of differential gene expression in *D. hansenii* as a result of extreme levels of salt exposure. Interestingly, as seen in Figure 2B, most of the significant genes presented fold changes ranging from  $\pm 1$  to  $\pm 3$ . Specifically, from all the upregulated genes observed at all time points (102), 30, 33 and 28 (89.22%) presented fold changes of 1, 2 and 3, respectively. The remaining 11 genes (10.78%) presented 4 (seven genes), 5 (two genes), 8 (one gene) and 11 (one gene) fold changes. Similarly, from 72 significant downregulated genes observed at all time points, 34, 26 and 10 genes

(97.22%) presented fold changes of 1, 2 and 3, respectively. The remainder were two genes with fold changes of 4 and 6, respectively. Importantly, from these data we conclude that fold changes as low as  $\pm 1$  may represent significant differential gene expression and could be of biological relevance.

Gene annotations were obtained from GenBank and putative functions were assigned based on the levels of homology to other genes in the databases.



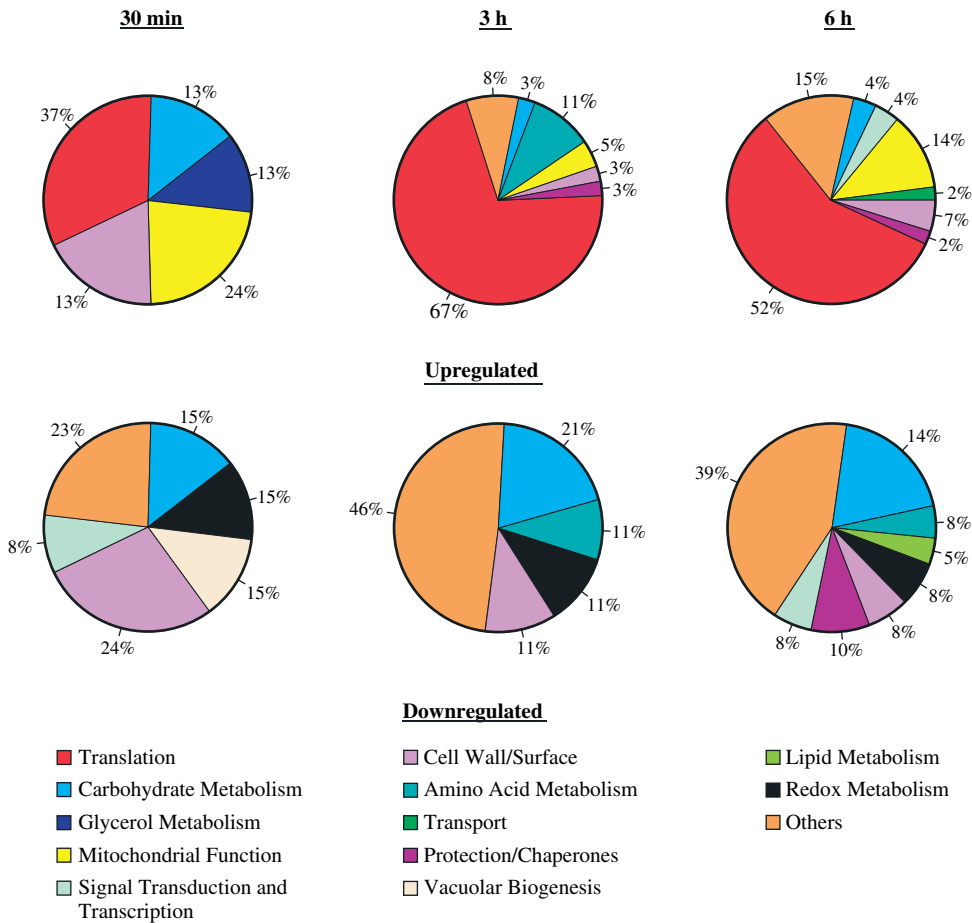
**Figure 2.** Genes differentially expressed after treatment with 2 M NaCl. (A) A Venn diagram showing significant genes for time points. Note that some genes are expressed exclusively at one time point, whereas others overlapped across time points (shown at the centre of the diagram). The figure clearly shows that most of the genes are expressed at 6 h after treatment with 2 M NaCl. (B) Fold changes of differentially expressed genes. The graph shows up- and downregulated genes based on fold changes for each time point. Fold changes were computed from the linear model fit. The graph confirms that the majority of the genes were upregulated at 6 h, with fold changes mostly in the range  $\pm 1$  to  $\pm 3$

Genes were classified as related to translation, carbohydrate metabolism, glycerol metabolism and other cellular processes. Genes presenting no similarities with any gene in the database or those of unknown function were classified as 'Others' (see Supporting information, Tables S1 and S2, for details of the complete information for all the genes that showed significant changes in our studies).

Figure 3 shows pie charts obtained from the functional analyses of the gene expression data. At 30 min, most of the upregulated genes (upper panel) were related to the protein synthesis machinery (37%), mitochondrial function (24%), cell wall/surface (13%), glycerol metabolism (13%), and carbohydrate metabolism (13%). Genes related to amino acid metabolism were upregulated at 3 h (11%) and 6 h (4%). Interestingly, a steady increase in the percentage of genes associated with the translational machinery occurred at 3 h (67%) and at 6 h (52%) and genes that were abundant at 30 min were reduced later in the time course experiment. On the other hand, genes classified as cell/wall surface (24%), others (23%), vacuolar biogenesis (15%), carbohydrate metabolism (15%), redox metabolism (15%) and signal transduction and transcription (8%) were downregulated at 30 min. At 3 h the following groups of genes were downregulated: 21% belong to carbohydrate metabolism, 46% to others, 11% to amino acid metabolism, 11% to redox metabolism, and 11% to cell wall/surface. Finally, at 6 h, 39% of the genes belong to others, 14% to carbohydrate metabolism, 8% to amino acid metabolism, 5% to lipid metabolism, 8% to redox metabolism, 8% to cell wall/surface, 10% to protection/chaperones and 8% to signal transduction.

### Expression pattern analyses

We performed expression pattern analysis for each time point for all significant genes, using the coefficient expression values obtained from the linear model fit computed by LIMMA (see Supporting information, Table S1). In general, we identified different patterns of gene expression for all differentially expressed genes, as determined by our previous statistical analyses of the microarray hybridization data. Representative gene sets are depicted in Figure 4A–D. The data on the graphs represent the expression values of genes as compared to the time 0 control. Figure 4A shows a

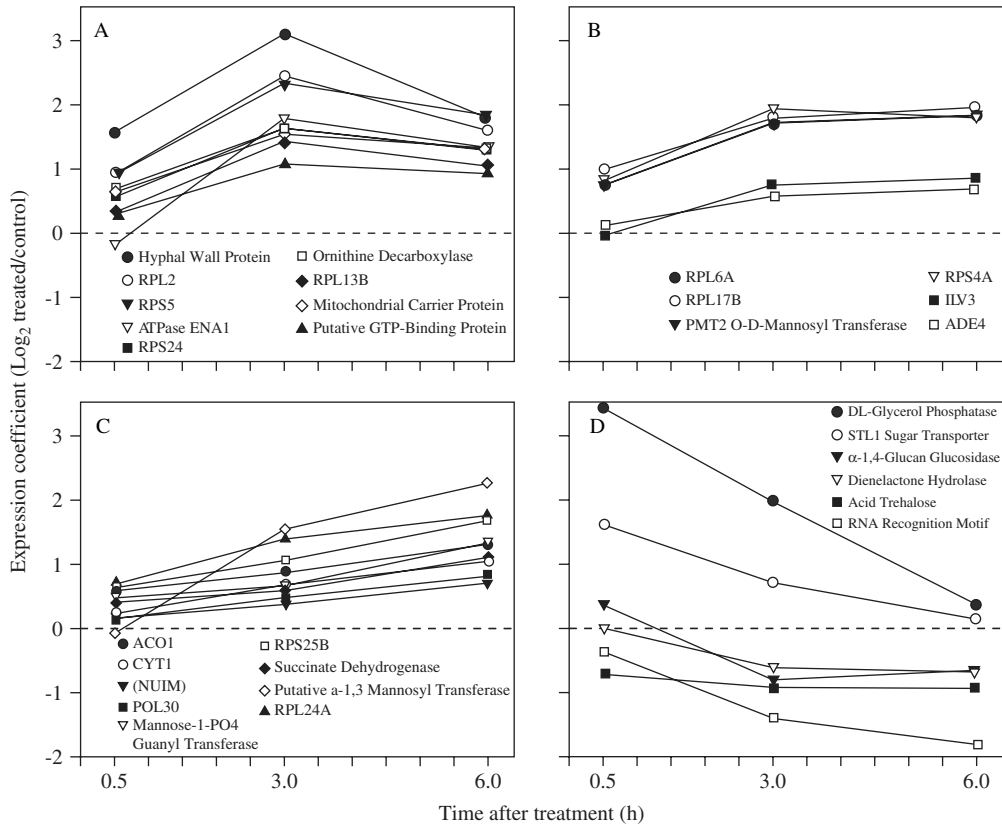


**Figure 3.** Temporal and functional gene-expression pie charts. The graphs show the percentage of up- and downregulated genes, based on their putative function occurring at 30 min, 3 h and 6 h after 2 M NaCl treatment. Note that most of the genes are differentially expressed at 3 and 6 h. Importantly, most of the upregulated genes were related to the protein synthesis machinery

group of genes that showed significant upregulation at all time points but demonstrated a peak of expression at 3 h and then returned to levels of expression similar to those seen at 30 min. This particular set of genes includes *Hyphal Wall Protein*, *ENA1p ATPase*, a putative GTP-binding protein (*OLA1*), *Mitochondrial Carrier Protein*, *Ornithine Decarboxylase*, as well as other genes possibly related to protein synthesis (*RPL2*, *RPS5*, *RPL10E-B* and *RPL13-60S*).

Figure 4B shows the patterns of expression of two sets of genes, one showing significant upregulation at all time points (compared to control) and another set of genes showing different levels of expression at the 3 and 6 h time points. These two sets include *RPS-4A*, *RPL17B* and *RPL6A* (all

related to translational processes) as compared to *RPL10E*, *ILV3* and *ADE4*, respectively. Figure 4C depicts a set of significant genes showing steady increases in expression going from the 30 min time point through the 3 and 6 h time points. Figure 4D also has two sets of genes. The first set of genes, composed of *DL-Glycerol Phosphatase* and *STL1-Sugar Transporter*, display significant upregulation at 30 min compared to control values. In addition, both genes subsequently displayed marked downregulation from the 30 min values at 3 and 6 h. Thus, these genes may be considered as being upregulated in an immediate-early and transient fashion. The second set of genes depicted in the graph include  *$\alpha$ 1-4 Glucan Glucosidase*, *Dienelactone Hydrolase*, *Acid Trehalase* (all related to sugar



**Figure 4.** (A–D) Expression pattern analysis of representative genes significantly expressed in the microarray experiments. Genes were grouped according to their similarities in gene expression coefficients obtained from the e-Bayes statistical analysis computed from LIMMA software

metabolism) and *RRM*–*RNA Recognition Motif*, the only gene related to RNA processing identified in our studies. As seen in the graph, these four genes display a steady trend of downregulation, peaking at 3 and/or 6 h.

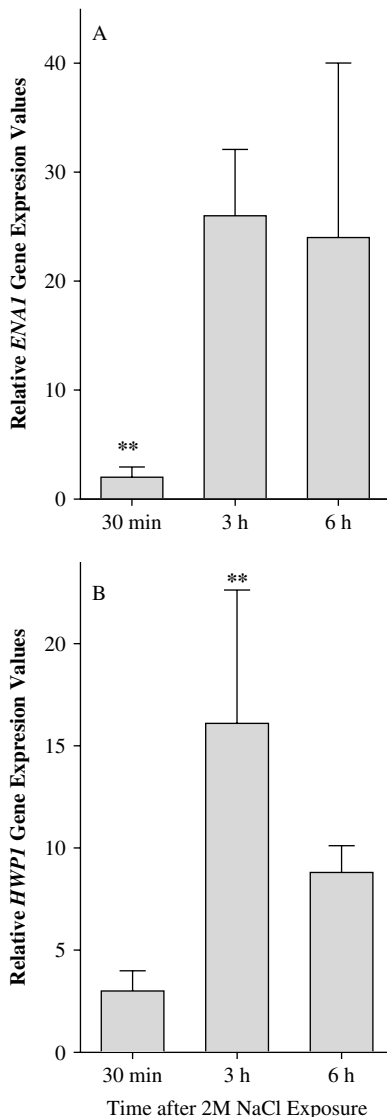
#### Validation of *ENA1* and *HWPI*, using qRT–PCR

Validation experiments were performed for the *ENA1* and *HWPI* genes using the real-time PCR approach [Figure 5A (*ENA1*) and 5B (*HWPI*)]. Selection of the genes for further validation studies was based on the statistical analysis and on the knowledge related to gene regulation under osmotic stress as known for other yeasts. Increased expression of the *ENA1* gene has been found to represent a crucial cellular response after salt challenge (Proft and Serrano, 1999). *ENA* genes play an important role in sodium and lithium tolerance (Prista *et al.*, 1997). They code for P-type ATPases, and

evidence has been presented that these ATPases mediate sodium, lithium and potassium efflux in yeasts (Haro *et al.*, 1991) and prevent sodium and lithium accumulation (Prista *et al.*, 1997). One-way ANOVA statistical analysis for the *ENA1* gene identified significant differences among the time points [ $F(3, 11) = 10.07$ ;  $***p < 0.005$ ]. Specific differences among the groups were detected by Tukey's multiple comparison *post hoc* analysis (0 vs. 3.0 h and 0 vs. 6.0 h;  $*p < 0.05$  for each comparison), 0.5 vs. 3.0 h and 0.5 vs. 6.0 h ( $+p < 0.05$  for each comparison).

The fungal cell wall is essential for maintaining the osmotic balance of the cell, for creating and maintaining the shape of the cell and for morphogenesis. Genomic and proteomic approaches have made it clear that ascomycetous yeasts incorporate a large number of different proteins in their cell walls and that protein incorporation is tightly controlled. The population of cell wall proteins may





**Figure 5.** (A, B) Graphs showing relative gene expression values for (A) *ENAI* and (B) *HWP1* genes obtained from validation studies using qRT-PCR. Symbols used in the graphs denote significance among timepoints as revealed by one-way ANOVA analysis

vary in composition, depending on the phase of the cell cycle, environmental conditions and developmental stage (De Groot *et al.*, 2005). *HWP1*, a wall-bound GPI protein, is a developmentally regulated gene expressed in germ tubes and true hyphae (Staab *et al.*, 1996). *HWP1* encodes for an outer mannoprotein, Hwp, which is known for its adhesive properties and whose expression has been correlated with the virulence of hyphal

forms in *C. albicans* (Bahn and Sundstrom, 2001). One-Way ANOVA analysis performed on the data obtained from the validation qRT-PCR studies from the *HWP1* gene identified significant differences among the different time points [ $F(3, 11) = 20.77$ ;  $***p < 0.0005$ ]. More specifically, the post-hoc Tukey's multiple comparison test detected significant differences between the 0 vs. 3.0 h ( $***p < 0.001$ ), the 0 vs. 6.0 h ( $*p < 0.05$ ), the 0.5 vs. 3 h ( $^{++}p < 0.01$ ) and the 3.0 vs. 6.0 h ( $^{\#}p < 0.05$ ) comparisons. Overall, the data obtained for both genes from the qRT-PCR confirm the patterns of gene expression as observed in the microarray experiments, thus suggesting that *ENAI* and *HWP1* genes are potential candidates involved in osmotolerance in *D. hansenii*.

## Discussion

Gene expression profiling of the osmoadaptation response of *D. hansenii* using microarrays presented here support the notion that this organism is highly adapted to conditions of hypersalinity. The results show that a high salt concentration produces an initial stress that upregulates two types of genes simultaneously: genes already known to be expressed under osmotic stress; and genes related to protein synthesis/maintenance of the cell. Then, the osmotic stress is rapidly overcome by an increment of genes related to protein synthesis. Fully adapted cells resume proliferation, are characterized by an adjusted energy and redox metabolism, maintain a higher glycerol level and display altered cell surface properties (Hohmann, 2002). Here we discuss four key elements of our results. First, surprisingly, no significant changes were detected in the transcription of  $\text{NAD}^+$  glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene (*GPD1*) that is known to be involved in the glycerol biosynthesis. Second, our results indicate an upregulation of genes encoding ribosomal proteins. Third, the number of upregulated genes related to mitochondrial functions is remarkable, drawing our attention to their possible involvement in maintaining a respiratory and metabolic capacity enhancing *D. hansenii*'s capability for osmoadaptation. Fourth, a change is observed in cell wall/surface-related genes, with some upregulated and others downregulated, suggesting that the cell wall is a highly dynamic system which remodels itself according to the external

conditions (Adams, 2004). We will discuss each finding briefly.

### Glycerol biosynthesis and osmoadaptation

The process of osmoadaptation in halotolerant organisms, such as yeasts and algae, has been well studied (Hasegawa, 2000; Ventosa *et al.*, 2004). In *S. cerevisiae*, the addition of salt activates the MAP kinase pathway, resulting in an increase in the expression of GPD1 and GPP1 (Ansell *et al.*, 1997; Keyse, 2000; Kultz and Burg, 1998). This increased expression results in increased synthesis of glycerol, an inert osmolyte that counteracts the effect of extracellular hyperosmolarity (Rep *et al.*, 1999; Estruch, 2000; Gonzalez-Hernandez and Pena, 2002). Increases in the activity of GPD1 in *S. cerevisiae* has been well documented by both Northern blots and expression arrays (Rep *et al.*, 2000; Gori *et al.*, 2005; Hirasawa *et al.*, 2006; Causton *et al.*, 2001).

While we did find increased mRNA levels of the *GPD1* gene, as others have, such changes did not reach statistical significance, as we employed stringent statistical analysis procedures. These results are in accordance with Hohmann (2002), where expression of *GPD1* and *GPP2* in *S. cerevisiae* is rapidly and transiently stimulated by an osmotic upshift. The same study reports that the mRNA of adapted cells growing in high osmolarity medium is enhanced only two- to five-fold, depending on the level of the osmotic stress (Albertyn *et al.*, 1994; Ansell *et al.*, 1997; Ericksson, 2000; Larsson, 1993; Rep *et al.*, 1999). Our microarray results also showed that, with the exception of *GPP1* and *ENA1* (Figure 5A), transcription of other genes commonly upregulated by osmotic stress in *S. cerevisiae*, such as dihydroxyacetone kinase (*DAK1*), phosphoglucosyltransferase (*PGM2*), and  $\alpha,\alpha$ -trehalose-phosphate synthase (*TPS3*) (Rep *et al.*, 2000; Hohmann, 2002) were not significantly upregulated in *D. hansenii*. It has to be noted here that microarray results always show a lower fold change than Northern blots.

The following *D. hansenii* genes have also been implicated or associated with salt tolerance: *TRK*, involved in transporting  $K^+$  (Prista *et al.*, 2007); *HAL2*, a phosphatase sensitive to salt (Aggarwal *et al.*, 2005); *NHX1*, a gene encoding a  $Na^+/H^+$  exchanger (Montiel and Ramos, 2007); and *NHAI*, a gene that encodes a plasma membrane

alkali-metal cation (Velkova and Sychrova, 2006). Our microarray studies did not detect significant induction of transcription of any of these genes.

### Ribosomal proteins

Genes encoding factors involved in rRNA synthesis and ribosome assembly are often observed to be coordinately downregulated in *S. cerevisiae* during salt stress (Rep *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001; Grigull *et al.*, 2004). The reduction in ribosomal protein genes allows energy to be reshuffled or diverted for increased expression of genes involved in protective responses, while maintaining basal levels of protein synthesis (Jelinsky and Samson, 1999).

The results presented here showed that in *D. hansenii* a large number of genes whose mRNA level encodes either ribosomal proteins or proteins involved in translation increased significantly in expression at all three time periods tested after osmotic shock. Thus, any temporary arrest in *D. hansenii* due to osmotic shock may be happening before the first time point (30 min) of the microarray analysis and the cells might be on their way to recovery by this time.

Posas *et al.* (2000) reported similar results in a microarray study where exposure of *S. cerevisiae* cells to 0.4 M for 10 min resulted in the induction of a rather large number of components of the protein biosynthesis machinery. This included 31 genes encoding ribosomal proteins and increases in the level of several aminoacyl-tRNA synthetases and a number of translation initiation factor mRNAs, including *TIF1*, *TIF2*, *PRT1*, *TIF11*, *HYP2* and *CDC95*. In this study the upregulation of a total of 28 ribosomal genes, one translating initiation factor (*PRT1*) and an arginyl tRNA synthetase was observed.

In their transcript expression analysis of *S. cerevisiae* at high salinity by microarray, Yale and Bohnert (2001) reported that nearly half of all upregulated transcripts (42%; 44 ORFs) originated from the category of protein metabolism, which is in accordance with the results presented here for *D. hansenii*, where almost half of all upregulated transcripts (46%, 30 ORFS) are from the protein synthesis category. Yale and Bohnert (2001) also found that expression patterns at 10 and 30 min were similar, with 67% of the ORFs induced after 10 min being identical to those induced after 30 min. These

profiles showed rapid transcript increases for ORFs in protein metabolism. After 90 min, only 13% of the upregulated genes were related to components involved in protein metabolism. Our results show a marked difference between the expression patterns for components of protein synthesis at 30 min (37%) and 3 h (67%), and a sustained increase (52%) at the 6 h time point. Yale and Bohnert attributed the difference in upregulation of ribosomal proteins (10 and 30 min) to adjustment of metabolism in *S. cerevisiae*, early during salt stress, while our results of a sustained upregulation might suggest that a translational gene regulatory mechanism plays a key role in *D. hansenii*'s osmoregulatory response.

Hirasawa *et al.* (2006) compared the function of genes in a brewing and a laboratory strain of *S. cerevisiae* after both were subjected to saline stress. These authors concluded that the faster response and adaptation in the brewing strain results from constitutively higher expression levels of genes related to ribosome biogenesis and assembly, as well as maintenance of protein synthesis despite the presence of high NaCl concentrations. Upregulation of ribosomal proteins has also been seen in organisms acclimating to other extreme environments. To acquire freezing tolerance in plants, changes in gene expression and *de novo* protein synthesis are required during cold acclimation (Guy, 1990; Thomashow, 1998). The induction of ribosomal protein genes may enhance the translation process or help with the proper assembly and functioning of ribosomes under low-temperature conditions (Kim *et al.*, 2004). A similar mechanism might be functional in *D. hansenii* during salt stress which results in an effective lowering of water availability intracellularly.

The apparent 'preparedness' at the level of transcription in this organism may indicate translational regulation in osmoadaptation. Alternatively, the discovery of as-yet unreported and unidentified genes that show enhanced transcription may be involved in osmoadaptation.

## Other genes

### Upregulated genes

Another group of upregulated genes observed in our microarray were those encoding for mitochondrial functions. *S. cerevisiae* requires energy to cope with stress, repair damage and maintain

cell homeostasis (Hohmann, 2002). Our observed induction of mitochondrial genes in *D. hansenii*, an average of 14% of the total genes upregulated (Figure 3), is consistent with the ability of *D. hansenii* to meet this energy demand.

The cell wall is essential for maintaining cell morphology and to protect cells from the external environment by preserving their osmotic integrity (Garcia *et al.*, 2004). It is sensible, then, to expect that osmotic stress affects processes related to cell surface assembly (Rep *et al.*, 2000). Consistent with these data, another category of upregulated genes in our microarray included those that encode for cell wall/surface biogenesis and modification (an average 7.6% of total upregulated genes) (Figure 3). Among the cell wall/surface genes upregulated in *D. hansenii* were those required for biosynthesis of mannoproteins (MNT1, MNN1, PMT2 and PSA1). Additionally, genes encoding for proteins involved in movement of molecules or ions across a phospholipid membrane, such as *STL1*, a glycerol/H<sup>+</sup> symporter (~1% of the total upregulated genes), were also upregulated, all of which utilize energy in keeping cell wall integrity.

### Downregulated genes

It should be noted that, contrary to well-documented sources (Hirasawa *et al.*, 2006; Rep *et al.*, 2000) regarding the induction of chaperones and genes involved in protective functions as a response to NaCl, we report here that the genes for heat shock proteins HSP12 and DDR48, as well as killer toxin KHR1, and vacuolar transporters were significantly downregulated. These same genes were upregulated in *S. cerevisiae* when subjected to osmotic shock (Hohmann, 2002; Rep *et al.*, 2000). The lack of a heat shock protein response might suggest that the threshold for inducing the stress response in *D. hansenii* is higher than for *S. cerevisiae*.

### Uncharacterized genes

Finally, our global microarray analysis revealed changes in 18 genes with unknown functions. Of these, four were upregulated and 14 were downregulated (unknown functions were classified as 'Others'; Figure 3). Characterization and additional studies of these genes are warranted to advance the understanding of salt tolerance and 'preparedness' of *D. hansenii*.

## Summary

The results presented here suggest major differences in the mechanism of salt tolerance between *S. cerevisiae* and *D. hansenii*. Additional studies on the coding sequences of the 'unknown' genes and the regulatory sequences for the highly regulated genes may provide new insights into pathways for survival in, or tolerance to, stress in our study organism. As an additional advantage the development of novel molecular tools could be useful in the expression of heterologous genes in *D. hansenii*.

## Acknowledgements

We thank our colleagues, especially members of Molecular Marine Biology Laboratory, Dr A. Perez-Matos and Dr C. Acevedo, for helpful discussions during the preparation of this manuscript. Special thanks go to Michelle Martínez-Montemayor and Carmen Rodríguez Rosa, from the FGRc, for technical assistance. Our gratitude is due to Genomechix LLC for their gift of oligonucleotides for our qRT-PCR studies. This work was supported in part by NIH-MBRS-SCORE (Grant No. GM08103) to N.S.G and NIH-NCRR (Grant No. P20 RR 15565) to S.P.O.

## Supporting information

Supporting information may be found in the online version of this article.

## References

- Adams DJ. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* **150**: 2029–2035.
- Adler L. 1986. *Physiological and Biochemical Characteristics of the Yeast Debaryomyces hansenii in Relation to Salinity*. Cambridge: New York.
- Aggarwal M, Bansal PK, Mondal AK. 2005. Molecular cloning and biochemical characterization of a 3',2',5'-bisphosphate nucleotidase from *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **22**: 457–470.
- Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM, Prior BA. 1994. *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* **14**: 4135–4144.
- Almagro A, Prista C, Benito B, *et al.* 2001. Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J Bacteriol* **183**: 3251–3255.
- Ansell R, Granath K, Hohmann S, *et al.* 1997. The two isoenzymes for yeast NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J* **16**: 2179–2187.
- Bahn YS, Sundstrom P. 2001. *CAP1*, an adenylate cyclase-associated protein gene, regulates bud-hypha transitions, filamentous growth, and cyclic AMP levels is required for virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **183**: 3211–3223.
- Bansal PK, Mondal AK. 2000. Isolation and sequence of the HOG1 homologue from *Debaryomyces hansenii* by complementation of the *hog1Δ* strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**: 81–88.
- Bansal PK, Sharma P, Mondal AK. 2001. A PBS2 homologue from *Debaryomyces hansenii* shows a differential effect on calcofluor and polymyxin B sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **18**: 1207–1216.
- Causton HC, Ren B, Koh SS, *et al.* 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell* **12**: 323–337.
- De Groot PWJ, Ram AF, Klis FM. 2005. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet Biol* **42**: 657–675.
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, *et al.* 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35–44.
- Ericksson P, Alipour H, Adler L, Blomberg A. 2000. Rap1p-binding sites in the *Saccharomyces cerevisiae* GPD1 promoter are involved in its response to NaCl. *J Biol Chem* **275**: 29368–29376.
- Estruch F. 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 469–486.
- Garcia R, Bermejo C, Grau C, *et al.* 2004. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem* **279**: 15183–15195.
- Gonzalez-Hernandez JC, Pena A. 2002. Adaptation strategies of halophilic microorganisms and *Debaryomyces hansenii* halophilic yeast. *Rev Latinoam Microbiol* **44**: 137–156.
- Gori K, Mortensen HD, Arneborg N, Jespersen L. 2005. Expression of the GPD1 and GPP2 orthologues and glycerol retention during growth of *Debaryomyces hansenii* at high NaCl concentrations. *Yeast* **22**: 1213–1222.
- Govind NS, McNally KL, Trench RK. 1992. Isolation and sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene from the euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii*. *Curr Genet* **22**: 191–195.
- Grigull J, Mnaimneh S, Pootoolal J, *et al.* 2004. Genome-wide analysis of mRNA stability using transcription inhibitors and microarrays reveals posttranscriptional control of ribosome biogenesis factors. *Mol Cell Biol* **24**: 5534–5547.
- Guerrero CA, Aranda C, Deluna A, *et al.* 2005. Salt-dependent expression of ammonium assimilation genes in the halotolerant yeast, *Debaryomyces hansenii*. *Curr Genet* **47**: 163–171.
- Gustafsson L, Norkrans B. 1976. On the mechanism of salt tolerance. Production of glycerol and heat during growth of *Debaryomyces hansenii*. *Arch Microbiol* **110**: 177–183.
- Guy CL. 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **41**: 187–223.
- Haro R, Garciadeblas B, Rodriguez-Navarro A. 1991. A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS* **291**: 189–191.

- Hasegawa P, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**: 463–499.
- Hirasawa T, Nakakura Y, Yoshikawa K, et al. 2006. Comparative analysis of transcriptional responses to saline stress in the laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae* with DNA microarray. *Appl Microbiol Biotechnol* **70**: 346–357.
- Hohmann S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300–372.
- Jelinsky SA, Samson LD. 1999. Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1486–1491.
- Keyse SM. 2000. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 186–192.
- Kim KY, Park SW, Chung YS, et al. 2004. Molecular cloning of low-temperature-inducible ribosomal proteins from soybean. *J Exp Bot* **55**: 1153–1155.
- Kultz D, Burg M. 1998. Evolution of osmotic stress signaling via MAP kinase cascades. *J Exp Biol* **201**: 3015–3021.
- Larsson C, Morales C, Gustafsson L, Adler L. 1990. Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *J Bacteriol* **172**: 1769–1774.
- Larsson K, Eriksson P, Ansell R, Adler L. 1993. A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase NAD<sup>+</sup> complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **10**: 1101–1111.
- Montiel V, Ramos J. 2007. Intracellular Na and K distribution in *Debaryomyces hansenii*. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of DhNHX1. *FEMS Yeast Res* **7**: 102–109.
- Norkrans B. 1966. Studies on marine occurring yeasts: growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Arch Mikrobiol* **54**: 374–392.
- Posas F, Chambers JR, Heyman JA, et al. 2000. The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem* **275**: 17249–17255.
- Prista C, Almagro A, Loureiro-Dias MC, Ramos J. 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4005–4009.
- Prista C, Gonzalez-Hernandez JC, Ramos J, Loureiro-Dias MC. 2007. Cloning and characterization of two K<sup>+</sup> transporters of *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology* **153**: 3034–3043.
- Prista C, Loureiro-Dias MC, Montiel V, et al. 2005. Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* **5**: 693–701.
- Proft M, Serrano R. 1999. Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol Cell Biol* **19**: 537–546.
- Rep M, Albertyn J, Thevelein JM, et al. 1999. Different signalling pathways contribute to the control of *GPD1* gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **145**(3): 715–727.
- Rep M, Krantz M, Thevelein JM, Hohmann S. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem* **275**: 8290–8300.
- Smyth GK, Speed TP. 2003. Normalization of cDNA microarray data. *Methods* **31**: 265–273.
- Smyth GK. 2004. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statist Appl Genet Mol Biol* **3**: (1, Article 3).
- Smyth GK. 2005. Limma: linear models for microarray data. In *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W (eds). Springer: New York; 397–420.
- Staab JF, Ferrer CA, Sundstrom P. 1996. Developmental expression of a tandemly repeated, proline- and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **271**: 6298–6305.
- Thomashow MF. 1998. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol* **118**: 1–7.
- Thome PE. 2004. Isolation of a *GPD* gene from *Debaryomyces hansenii* encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase NAD<sup>+</sup>. *Yeast* **21**: 119–126.
- Thome PE. 2005. Heterologous expression of glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene *DhGPD1* from the osmotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Microbiol* **51**: 87–90.
- Thome PE. 2007. Cell wall involvement in the glycerol response to high osmolarity in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **91**: 229–235.
- Thome PE, Trench RK. 1999. Osmoregulation and the genetic induction of glycerol-3-phosphate dehydrogenase by NaCl in the euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii*. *Mar Biotechnol NY* **1**: 230–238.
- Velkova K, Sychrova H. 2006. The *Debaryomyces hansenii* *NHA1* gene encodes a plasma membrane alkali-metal-cation antiporter with broad substrate specificity. *Gene* **369**: 27–34.
- Ventosa A, Gutierrez MC, Kamekura M, et al. 2004. Taxonomic study of *Halorubrum distributum* and proposal of *Halorubrum terrestre* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 389–392.
- Yale J, Bohnert HJ. 2001. Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *J Biol Chem* **276**: 15996–16007.