

Bioinformática en la búsqueda de factores de transcripción

Marissa Calderón-Torres y Miguel Murguía-Romero

Octubre, 2017

Radicales libres, sistemas antioxidantes y enfermedades crónico-degenerativas

En diferentes enfermedades crónico-degenerativas, por ejemplo la diabetes mellitus tipo II, hay daño por oxidación de los componentes de las células, es decir de proteínas, lípidos y ADN. La oxidación es ocasionada por radicales libres. Los efectos de la oxidación se pueden evitar, pues existen moléculas benéficas que atrapan o reaccionan con los radicales libres. Estas moléculas de protección forman parte de los sistemas antioxidantes, por ejemplo la vitamina C que contiene el jugo de limón o la vitamina E de las zanahorias. Pero en el desarrollo de las enfermedades crónico-degenerativas aumenta el nivel de radicales libres, tanto que rebasa a los sistemas antioxidantes y el exceso de radicales libres oxida los componentes celulares. El daño por oxidación puede ser reversible pero en la mayoría de los casos es irreversible y las biomoléculas se degradan o se acumulan porque no tenemos sistemas de reparación. En este trabajo reportamos que la levadura *Debaryomyces hansenii*, de origen marino, tiene un sistema de reparación de daños por oxidación.

La levadura extremotolerante al sodio *Debaryomyces hansenii*

Debaryomyces hansenii (Figura 1) es una levadura extremotolerante al sodio, es decir, vive exitosamente tanto en ausencia como en presencia de sodio, hasta una concentración de NaCl tan alta como 240 g/L. Como ejemplo de comparación, si vas a nadar a las playas de Acapulco o Veracruz y casualmente has tomado agua de mar, sabrás que sabe muy salada, pero el agua de mar tiene tan solo 35 g/L de sodio ¡y *D. hansenii* soporta seis veces más! De esta capacidad para sobrevivir en hábitats de tan diferente salinidad se desprende el interés de investigar los mecanismos moleculares que tiene *D. hansenii* para responder al aumento de la salinidad del medio; hasta ahora se han reportado genes que principalmente tienen que ver con proteínas de la síntesis de glicerol, que expulsan sodio al exterior de la célula o que lo atrapan en la

vacuola (Figura 2), pero esto no es suficiente para explicar la extremotolerancia de *D. hansenii*.

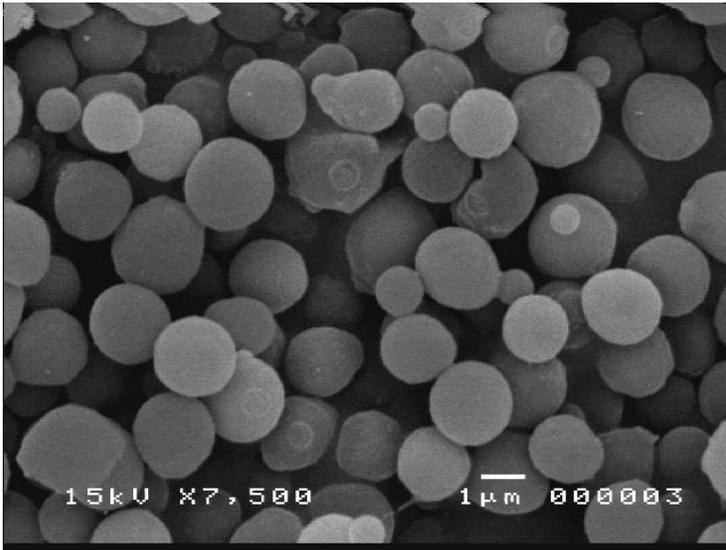


Figura 1. Fotografía de microscopio electrónico de barrido de la levadura *Debaryomyces hansenii*.

Créditos: Daniela Castro y Marissa Calderón Torres, 2003

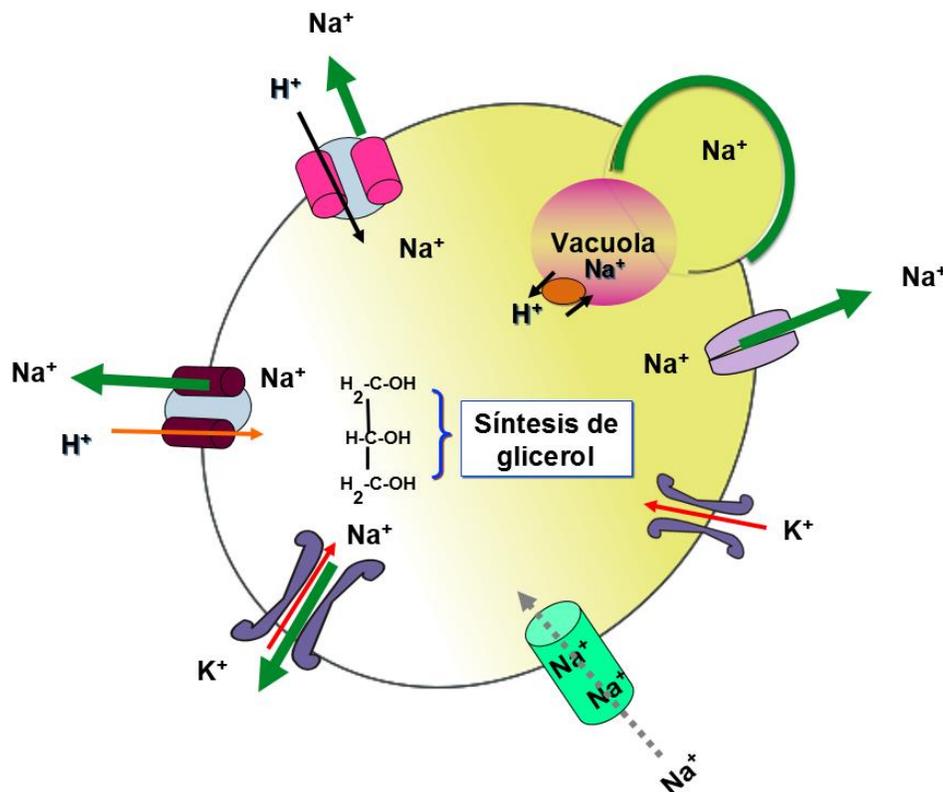


Figura 2. Mecanismos del transporte de sodio en *Debaryomyces hansenii* durante estrés salino (Modificado de Prista *et al.*, 2016)

Genes de respuesta a estrés de *D.hansenii*

Conocer cuáles son los genes de respuesta al estrés salino es todo un reto, porque hay que determinar cuántas copias de ARN mensajero se hacen de cada gen y encontrar las proteínas maestras que dirigen la orquesta de qué genes se deben transcribir y cuándo, es decir, las proteínas maestras son las que regulan la transcripción de genes para que lleven al cabo la reparación y restauración de las funciones celulares. Las proteínas maestras reciben el nombre de factores de transcripción (Figura 3). En el humano se conocen alrededor de 3,000 factores transcripción, pero en *D. hansenii* no se conocen muy bien.

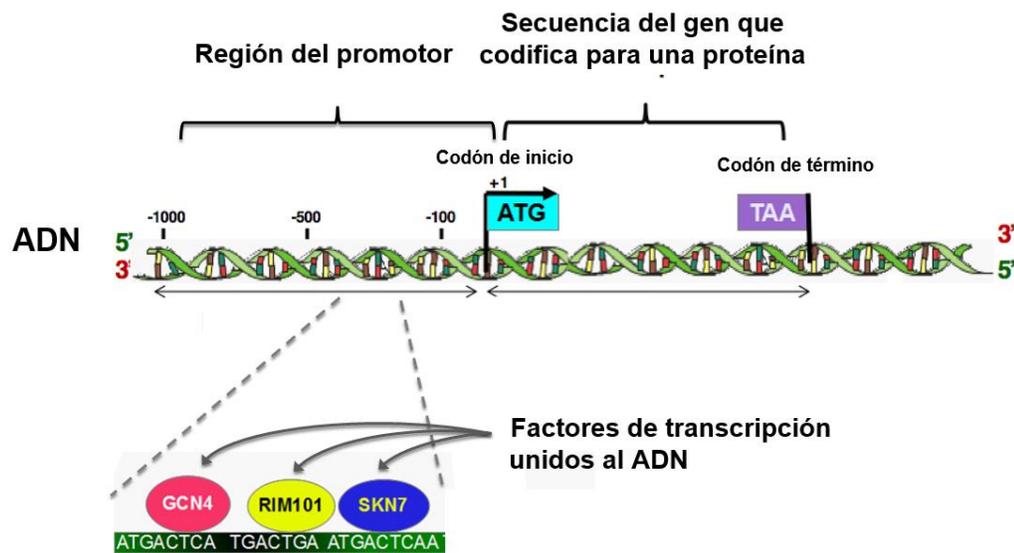


Figura 3. Esquema de los factores de transcripción y su unión a la región del promotor de un gen.

El estrés por fuente de nitrógeno y las enzimas denitrificas

Aunado a la complejidad de buscar los genes de respuesta al estrés salino, recientemente se reportó que durante el estrés salino en *D. hansenii* se presenta estrés oxidante, lo que implica que la levadura también responde a los radicales libres durante el aumento de salinidad del medio.

Los radicales libres son el producto de reacciones de óxido-reducción que ocurren dentro de la célula que cuando se producen en niveles bajos no son lo terrible que se presume, por el contrario, son benéficos, pues tienen función como moléculas de señalización de diferentes procesos celulares, por ejemplo, en las plantas activan

procesos de germinación. El problema se presenta cuando aumentan los radicales libres producidos por el oxígeno o el nitrógeno, conocidos como especies reactivas del oxígeno (ERO) y especies reactivas del nitrógeno (ERN), respectivamente. Es entonces cuando los sistemas antioxidantes son insuficientes y este desequilibrio conduce a que en la célula se establezca una condición conocida como estrés oxidante y se produzcan daños por oxidación en moléculas como el ADN, el ARN y proteínas de la célula (Figura 4).



Figura 4. Esquematización del establecimiento de la condición de estrés oxidante celular por un desbalance entre radicales libres y antioxidantes.

Los daños por oxidación pueden ser irreversibles, por ejemplo, la oxidación del aminoácido tirosina de las proteínas resulta en la formación de tirosina oxidada del tipo 3-nitrotirosina (Figura 5). En el presente trabajo reportamos que la levadura *D. hansenii* puede asimilar y crecer en presencia de 3-nitrotirosina como única fuente de nitrógeno. Y lo que es mejor, que *D. hansenii* puede revertir el daño de oxidación de 3-nitrotirosina, ya que tiene enzimas con actividad de denitrasas, esto significa que estas enzimas remueven el grupo NO₂ de la 3-nitrotirosina.

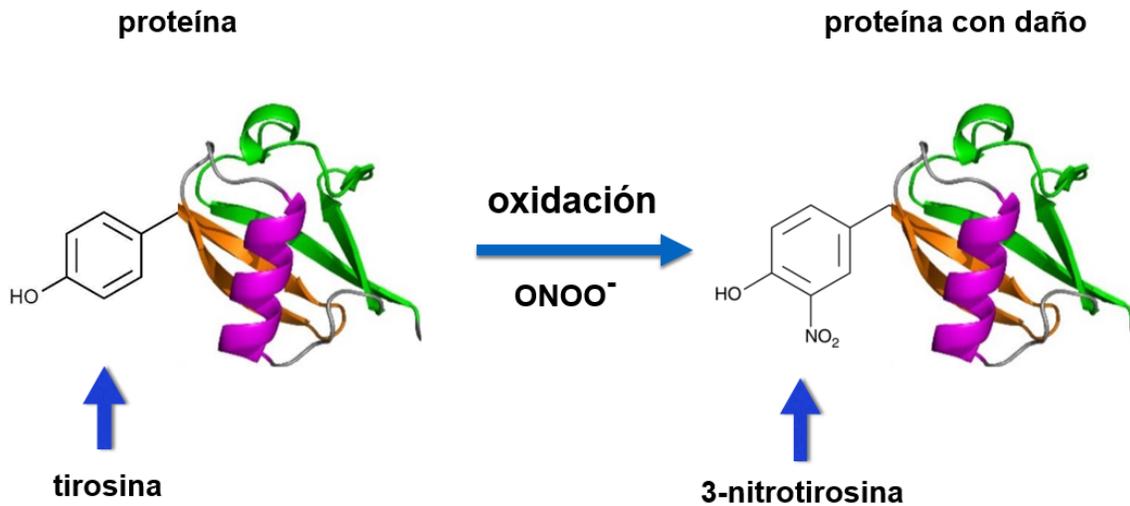


Figura 5. Reacción de oxidación del aminoácido tirosina de una proteína con la formación irreversible del aminoácido oxidado 3-nitrotirosina.

La oxidación de aminoácidos aromáticos como la tirosina ocurre en la mayoría de las ocasiones por el peroxinitrito (ONOO^-), que es un radical libre derivado de las especies reactivas del nitrógeno.

Los factores de transcripción de respuesta a estrés

Los factores de transcripción son proteínas que regulan la transcripción, es decir que pueden activarla o reprimirla. La característica principal de estas proteínas es la unión específica a secuencias del ADN, es decir, que a cada factor de transcripción le corresponde sólo una secuencia de ADN; estas secuencias son cortas y se les denomina secuencia de unión consenso, por ejemplo en la Tabla 1, el factor de transcripción Gln3p de levaduras reconoce y se une a la secuencia de nucleótidos GATAAG. Las secuencias de unión se encuentran en la región del promotor de los genes (Figura 3).

Tabla 1. Secuencias de los sitios de unión en la región del promotor de *Debaryomyces hansenii* que se usaron para la búsqueda *in silico*.

Nombre del factor de transcripción	Tipo de estrés al que responde	Secuencia del sitio de unión
Skt1p	Salino	TGACGTM
Msn2p/Msn4p	Salino	AGGGG
Yap1p	Oxidante	TTABTAA
Skn7p	Oxidante	GGCYGGC
Gat1p	Cambio de fuente de nitrógeno	WGATWRH
Gln3p	Cambio de fuente de nitrógeno	GATAAG

Las letras A, C, G y T simbolizan a las bases adenina, citosina, guanina y timina, las otras letras representan alguna de dos o tres bases: R=A o G; Y=C o T; W=A o T; M=A o C; B=C, G o T; H=A, C o T.

Una base de datos para el análisis bioinformático

Para realizar la búsqueda de los genes de *D. hansenii* responsables de afrontar con éxito las condiciones extremas, tanto de salinidad como de crecer en un medio en el que la única fuente de nitrógeno sea el compuesto oxidado 3- nitrotirosina, construimos una base de datos de los genes de esta levadura. Nos interesaba tener en la base de datos diversos tipos de información sobre el genoma:

- La lista de los nombres de genes identificados en *D. hansenii*.
- Una asociación sobre las funciones identificadas en la ontología GO para cada gen.
- Una asociación sobre qué factores de transcripción están en la región del promotor (también conocida como *UpStream*) de cada gen.

Obtuvimos de la web (<http://igenolevures.org>) la lista de los genes de *D. hansenii*, en total 6252 genes. Además, para cada gen obtuvimos la secuencia 1000 bases “río arriba” a partir del codón de inicio, conocida como la región del promotor del gen o *UpStream*.

a) LISTA_DE_GENES

GENE
1 DEHA2A00110g
2 DEHA2A00132g
3 DEHA2A00154g
4 DEHA2A00176g
5 DEHA2A00198g
...
6248 DEHA2G25036g
6249 DEHA2G25058g
6250 DEHA2G25080g
6251 DEHA2G25102g
6252 DEHA2G25124g

b) TERMINOS_GO_POR_GEN

GENE	PCF	TERMINO_GO
DEHA2A04642g	biological_process	cell septum assembly
DEHA2A04642g	biological_process	cell wall chitin biosynthetic process
DEHA2A04642g	biological_process	chitin biosynthetic process
DEHA2A04642g	biological_process	pathogenesis
DEHA2A04642g	cellular_component	cell septum
DEHA2A04642g	cellular_component	integral component of membrane
DEHA2A04642g	cellular_component	membrane
DEHA2A04642g	molecular_function	chitin synthase activity
DEHA2A04642g	molecular_function	transferase activity, transferring hexosyl groups

c) FT_EN_GENES

ID_GENE	NOMBRE	FACTOR_DE_T	POSICION
1 DEHA2A00110g	Dal80p		-688
1 DEHA2A00110g	Msn2p/Msn4p		-973
1 DEHA2A00110g	GAT1		-994
1 DEHA2A00110g	GAT1		-889
1 DEHA2A00110g	GAT1		-374
1 DEHA2A00110g	GAT1		-331
1 DEHA2A00110g	GAT1		-289
1 DEHA2A00110g	GLN3		-687
2 DEHA2A00132g	Yap1		-790
2 DEHA2A00132g	Yap1		-414
2 DEHA2A00132g	Yap1		-151
2 DEHA2A00132g	GAT1		-651
2 DEHA2A00132g	GAT1		-609
2 DEHA2A00132g	GAT1		-417
2 DEHA2A00132g	GAT1		-161
2 DEHA2A00132g	GAT1		-154

Figura 6. Algunas tablas y registros de la base de datos usada en la búsqueda *in silico*. a) Tabla de los nombres de genes identificados en *D. hansenii*; b) Tabla de las anotaciones de la ontología GO mostrando los registros para dos genes de *D. hansenii*; c) Algunos registros de la tabla con la lista de asociación de los factores de transcripción identificados en la región del promotor (*UpStream*) de cada gen.

Búsqueda *in silico* de los genes de las denitrasas

Teniendo ya instalada en la base de datos la lista de los factores de transcripción y su asociación con los genes de *D. hansenii* pudimos realizar con facilidad consultas para identificar genes que cumplieran algunas características, en particular realizamos consultas en las que identificamos genes cuya región del promotor o *UpStream* contuviera al menos una secuencia de sitio de unión a un factor de transcripción de respuesta a cada tipo de estrés considerado: salino, oxidante y cambio de fuente de nitrógeno, o bien la combinación de secuencias para estrés oxidante y por cambio de fuente de nitrógeno. Esto resultó en más de 2,500 genes, por lo que restringimos la lista con base en las anotaciones de la base de datos de la ontología GO (<http://www.geneontology.org>): aquellos genes codificantes de enzimas denitrasas o con función de óxido-reductasa. Con esta estrategia pudimos reducir la lista a 15 genes. Era muy probable que estos genes formaran parte de los mecanismos que le permiten a la levadura afrontar el estrés oxidante por sodio.

Experimentos para corroborar los genes identificados

Posteriormente evaluamos si en *D. hansenii* crecida en condiciones de estrés salino y oxidante había un cambio en el número de copias del ARN mensajero de los genes identificados con función de denitrasas, es decir, que estuvieran sobre-expresados.

Para ello, crecimos a la levadura en presencia de NaCl 2M o de 3-NT 10 mM por 15 horas, luego extrajimos el ARN total y con la técnica de RT-PCR determinamos el número de copias del ARN mensajero de cada gen, el resultado fue que aumentó el ARN mensajero de los tres genes que encontramos con función de denitrasa y oxido-reductasa.

Conclusiones

La levadura *D. hansenii* puede crecer en presencia del compuesto oxidado 3-nitrotirosina como única fuente de nitrógeno y tiene una alta actividad de denitrasa para degradarla cuando se crece en medios con 1 y 2 M NaCl. Los genes identificados mediante la búsqueda *in silico*, usando las secuencias de sitios de unión de los factores de transcripción reportados para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, pueden explicar parte de los mecanismos en *D. hansenii* para la asimilación de 3-nitrotirosina. Esta estrategia de búsqueda es especialmente útil en organismos para los que no se conocen las secuencias de sus factores de transcripción y puede ayudar a mejorar el conocimiento de su genoma. Los genes que confieren la capacidad antioxidante de *D. hansenii* pueden usarse en aplicaciones biomédicas para la reducción de compuestos oxidados en pacientes con enfermedades crónico degenerativas.

Referencias

[Putative 3-nitrotyrosine detoxifying genes identified in the yeast *Debaryomyces hansenii*: In silico search of regulatory sequences responsive to salt and nitrogen stress.](#) Castro DE, Murguía-Romero M, Thomé PE, Peña A & Calderón-Torres M. 2017. *Electronic Journal of Biotechnology* 29:1-6.

[The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts.](#) Prista C, Michán C, Miranda IM y Ramos J. 2016. *Yeast* 33:523-533.

DEHA *Debaryomyces hansenii*. www.deha.abacoac.org. Accedida el 2/oct/2017.



Agradecimientos:

La fotografía de la Figura 1 se realizó con apoyo de la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.



Acerca de los autores:

Marissa Calderón-Torres <cmarissacalderon@gmail.com> es profesora en FES Iztacala, UNAM. Coordinadora del grupo Deha (www.deha.abacoac.org). Su línea de investigación es la regulación de la transcripción del estrés salino y oxidante de la levadura *Debaryomyces hansenii* y sus aplicaciones de biotecnología.

Miguel Murguía-Romero <miguelmurguia@gmail.com> es técnico académico de la FES Iztacala y profesor del Departamento de Matemáticas de la Facultad de Ciencias, UNAM. Su línea de investigación es la Informática Biomédica y la Informática de la Biodiversidad.

Invitamos a los lectores a hacernos llegar sus comentarios a cualquiera de nuestros correos electrónicos.

En este escrito explicamos de una manera simplificada los resultados publicados en un artículo del que somos coautores (Castro *et al.* 2017) y en el que puedes obtener información más detallada. Si te fue de utilidad alguna información de este manuscrito de difusión puedes citar el artículo original:

Castro DE, Murguía-Romero M, Thomé PE, Peña A & Calderón-Torres M. 2017. **Putative 3-nitrotyrosine detoxifying genes identified in the yeast *Debaryomyces hansenii*: In silico search of regulatory sequences responsive to salt and nitrogen stress.** *Electronic Journal of Biotechnology* 29:1-6.

Preguntas guía

Estas preguntas te podrán servir como una guía introductoria para comprender qué función tienen los factores de transcripción y algunos aspectos bioinformáticos orientados al análisis del genoma de *D. hansenii*.

- 1) ¿Qué es y qué función tiene la secuencia promotora de un gen?
- 2) ¿Qué es un factor de transcripción?
- 3) ¿Qué tipo de información proporciona la ontología GO?
- 4) Realiza el siguiente ejercicio:
 - a) Obtén el archivo del artículo Castro *et al.* (2017: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.06.003>) y observa en la Tabla 1 cuántas copias de cada tipo de factor de transcripción tiene el gen DEHA2E24178g.
 - b) Entra a la página deha.abacoac.org y en la sección “base de datos” opción “Frecuencia de los sitios de unión en los genes” genera la consulta para verificar la información de la Tabla 1 del artículo de Castro *et al.* (2017).
 - c) ¿Qué otros factores de transcripción reporta la consulta además de los considerados en la Tabla 1 en este manuscrito de difusión?



Copyright © 2017 por I@s autor@s (Marissa Calderón-Torres y Miguel Murguía-Romero). Este trabajo tiene licencia bajo los términos de Creative Commons Attribution International License (CC BY).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

