



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EXPRESIÓN DEL GEN *DhCTT1* DE *Debaryomyces hansenii* EN UNA MUTANTE
ACATALASÉMICA DE *Saccharomyces cerevisiae*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

ROMÁN ALFONSO CASTILLO DÍAZ

TUTORA: DRA. CLAUDIA ANDREA SEGAL KISCHINEVZKY

2013





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Castillo

Díaz

Román Alfonso

55 95 06 38

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

406056210

2. Datos del tutor

Dra.

Claudia Andrea

Segal

Kischinevzky

3. Datos del sinodal 1

Dr. Whilhelm

Hansberg

Torres

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Víctor Manuel

Valdés

López

5. Datos del sinodal 3

Quim.

Viviana

Escobar

Sánchez

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Fabiola

Ramírez

Corona

7. Datos del trabajo escrito

Expresión del gen *DhCTT1* de *Debaryomyces hansenii* en una mutante acatalasémica de *Saccharomyces cerevisiae*.

79 p

2013

DEDICATORIAS

El siguiente trabajo se lo dedico a mis padres Rosario y Alfonso Jesús por su apoyo durante todos estos años y porque sólo gracias a ustedes he podido completar satisfactoriamente este trabajo. Estoy muy feliz de que ustedes sean mis padres, me siento orgulloso de ustedes y los quiero mucho

A mi hermano Adrián Alfonso, por todo lo que pasamos juntos; eres la persona que ha pasado más tiempo conmigo desde que nací, por todos los momentos divertidos y por el apoyo que representas en mi vida. Te quiero hermano

A Karla Priscilla, jamás pensé encontrar a alguien como tú, por ti puedo vivir lo que sea y pasar por donde sea. Eres parte fundamental en cada aspecto de mi vida...Te amo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Luisa Alba Lois, por aceptarme como parte de su equipo en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica y por el tiempo que dedicó a este proyecto

Agradezco a la Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky, mi tutora, por todo su apoyo a lo largo de este trabajo; porque gracias a su generosidad, dirección, y sobre todo paciencia he logrado pulir las asperezas que me limitaban y también desarrollar habilidades para ser cada día mejor y continuar en este caminar de la ciencia

Al Dr. Wilhelm Hansberg Torres, porque verdaderamente me ayudó en la revisión de la Tesis que fue de carácter y rigor científico, y por la complementación de mis conocimientos con todas sus sugerencias.

Al Dr. Víctor Manuel Valdés López, porque cuando era el momento de hacer críticas constructivas siempre fue un placer; tus observaciones y propuestas fueron fundamentales en este trabajo.

A la Quim. Viviana Escobar Sánchez y al M. en C. Aristides III Sampieri Hernández, por sus conocimientos tanto técnicos como prácticos que fueron fundamentales en el desarrollo del trabajo en el laboratorio.

A todos mis sinodales por el tiempo dedicado a este trabajo

A la M. en C. Beatriz Rodarte Murguía que el día de hoy descansa, por compartir con todos en el laboratorio ese espíritu de búsqueda y determinación.

A todos mis amigos porque sin ustedes me habría dado flojera acabar la carrera, varios son un ejemplo y he aprendido mucho de ustedes.

A PAPIIT IN 218611-3 “Estrés oxidativo en *Debaryomyces hansenii* “ por el financiamiento brindado al laboratorio con el cual se llevó a cabo este proyecto. Asimismo le agradezco también la beca que me brindó durante el último año.

Tabla de contenido

RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO.....	9
EL OXÍGENO UNA OPORTUNIDAD Y UN RIESGO.....	9
DESCUBRIMIENTO DEL OXÍGENO.....	10
DESCUBRIMIENTO DE LAS ERO Y SU ACEPTACIÓN EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS	10
FORMACIÓN DE LAS ERO.....	11
<i>Camino de Beckman-Radi-Freeman</i>	11
<i>Reacciones de Fenton</i>	12
<i>Producción de ERO por la mitocondria</i>	12
<i>Producción de las ERO en los peroxisomas</i>	14
<i>Producción de ERO en el retículo endoplásmico</i>	15
<i>La familia NOX</i>	15
ESTRÉS OXIDANTE.....	16
LAS ERO Y EL DAÑO CELULAR.....	17
<i>Daños al DNA por las ERO</i>	17
<i>Daños a proteínas por las ERO</i>	18
<i>Daños a los lípidos y su peroxidación</i>	18
<i>Funciones de las ERO</i>	19
MECANISMOS ANTIOXIDANTES.....	21
<i>Canales mitocondriales inespecíficos</i>	21
<i>Proteínas desacoplantes</i>	22
<i>Cadenas ramificadas transportadoras de electrones</i>	23
<i>Superóxido dismutasa</i>	23
<i>Glutatión</i>	23
<i>Glutatión peroxidasa</i>	24
<i>Tiorredoxinas</i>	24
<i>Las catalasas</i>	25
<i>DEBARYOMYCES HANSENI</i>	26
JUSTIFICACIÓN.....	29
OBJETIVOS.....	31

OBJETIVO GENERAL.....	31
OBJETIVOS PARTICULARES.....	31
MATERIAL Y MÉTODOS	32
CEPAS	32
CONDICIONES DE CULTIVO Y CRECIMIENTO.....	32
OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	33
TRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i> Y MINIPREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS	34
PREPARACIÓN DEL PLÁSMIDO PRS316.....	35
EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO DE <i>D. HANSENI</i>	37
CEBADORES Y PCR PARA AMPLIFICAR <i>DHCTT1</i>	38
DOBLE DIGESTIÓN CON <i>BAMHI</i> Y <i>SALI</i>	41
PURIFICACIÓN DE DNA DE GEL DE AGAROSA	41
LIGACIÓN DE <i>DHCTT1</i> Y PRS316.....	42
TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA ACATALASÉMICA	42
OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PROTEICO	44
ENSAYO DE BRADFORD: CONCENTRACIÓN TOTAL DE PROTEÍNAS	45
ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE CATALASA.....	45
ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS (PAGE, <u>P</u> OLYACRYLAMIDE <u>G</u> EL	
<u>E</u> LECTROPHORESIS, LAEMMLI 1970).....	46
TINCIÓN DEL GEL PARA OBSERVAR LA ACTIVIDAD DE CATALASA (WOODBURY Y	
COLS. 1971).....	48
ALINEAMIENTO DE LAS REGIONES 5' RÍO ARRIBA.....	48
DETECCIÓN DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE UNIÓN DE FACTORES DE	
TRANSCRIPCIÓN.....	48
RESULTADOS	49
CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	49
EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO DE <i>D. HANSENI</i>	50
CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO PRS316:: <i>DHCTT1</i>	51
TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA ACATALASÉMICA	55
EN EL MEDIO YPD EL PRS316:: <i>DHCTT1</i> INCREMENTA LA BIOMASA DE LA CEPA	
ACATALASÉMICA TRANSFORMADA.	56
ENSAYO DE BRADFORD.....	58
ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LAS CEPAS	59

ESTUDIO DE LAS REGIONES 5' RÍO ARRIBA Y 3' RÍO ABAJO.....	60
<i>Región 5' río arriba de D. hansenii del gen DhCTT1</i>	60
<i>Región 5' río arriba de S. cerevisiae del gen ScCTT1</i>	61
DISCUSIÓN	63
CONSTRUCCIÓN Y TRANSFORMACIÓN DEL PLÁSMIDO PRS316 <i>DHCTT1 EN S.</i>	
<i>CEREVISIAE</i>	63
CURVAS DE CRECIMIENTO	64
SECUENCIAS 5' RÍO ARRIBA.....	67
CONCLUSIONES	71
REFERENCIAS	72

RESUMEN

Se amplificó el gen homólogo al de *Saccharomyces cerevisiae* de la catalasa citosólica T de la levadura *Debaryomyces hansenii*, incluyendo 1,000pb río arriba y 300pb río abajo para incluir al promotor completo y a las regiones 5' y 3' UTR del mensajero. El amplicón se clonó en el plásmido pRS316 y la construcción pRS316::*DhCTT1* fue introducida en una mutante acatalasémica de *Saccharomyces cerevisiae*.

Mediante ensayos de actividad específica y tinción en gel de poliacrilamida después de separar las enzimas mediante PAGE, se corroboró la restauración de la actividad de catalasa. La expresión de este gen en las cepas transformadas proporciona la capacidad de alcanzar mayor biomasa en medio YPD con respecto a la cepa silvestre y al resto de las mutantes.

La actividad de la catalasa en las cepas acatalasémicas transformadas es mayor que en la cepa silvestre, pero no superaron la actividad de catalasa de *D. hansenii*.

Para explicar la expresión del plásmido se realizó un análisis bioinformático de las regiones 5' río arriba, para detectar los factores de transcripción de *S.cerevisiae* que pudieran estar interactuando con el promotor contenido en pRS316::*DhCTT1*; los resultados de este análisis permiten proponer hipótesis de el por qué de la transcripción del gen *DhCTT1* en *S. cerevisiae*, las cuales concuerdan de manera estrecha con la biología de los organismos estudiados.

INTRODUCCIÓN

La investigación en torno a las catalasas ha arrojado resultados relevantes en varios aspectos de las células como pueden ser: el lapso de vida, el envejecimiento celular, su relación con el sistema inmune, con la síntesis de hormonas, la apoptosis, su relación con la diabetes, con el cáncer, etc. Es por estos motivos, que estudiar las catalasas y comprender su relación con lo mencionado anteriormente abre no sólo un campo a la investigación, también ofrece la posibilidad del desarrollo de nuevos tratamientos para prolongar la vida de los tejidos, mejorar la respuesta inmune, prevención del cáncer, entre otras cosas.

Especies reactivas del oxígeno

Las especies reactivas del oxígeno es un término que agrupa a radicales oxígeno, como superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo ($\bullet OH$), peróxilo ($RO_2^{\bullet-}$), hidroperoxilo (HO_2^{\bullet}), como a otros agentes no radicales oxidantes como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) y ozono (O_3), que pueden convertirse fácilmente en radicales libres. Se define como radical libre cualquier especie química que tiene uno o más electrones no apareados (Bayr 2005).

El oxígeno una oportunidad y un riesgo

En la historia de nuestro planeta, aproximadamente 2.0 billones de años atrás la concentración de oxígeno en la atmósfera de nuestro planeta se incrementó considerablemente (Kasting 1993). Los procariontes que habitaban la tierra se encontraron ante un reto y a la vez una oportunidad. La posibilidad de utilizar la reactividad del oxígeno para la producción de energía fue la oportunidad; pero, concomitantemente, también se presentó la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), capaces de dañar los componentes celulares (Scandalios 2002). Desde ese momento, las ERO se volvieron importantes y han evolucionado varios mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para contender con ellas.

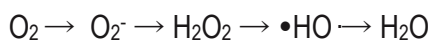
Descubrimiento del oxígeno

El oxígeno fue descubierto por Carl Wilhelm Scheele y lo reportó en 1777. Posteriormente se descubrió que el oxígeno es suministrado al cuerpo de los animales por la respiración y se pensó que serviría para eliminar el dióxido de carbono producido por el metabolismo celular; se comprendió que en las células la combustión se puede realizar a la temperatura corporal gracias a la ayuda de enzimas. En esos momentos el oxígeno era considerado benéfico; sin embargo, al observar que la elevada exposición a oxígeno en bebés nacidos prematuramente a los que se les suministra oxígeno en la incubadora o en buzos cuyo tanque está mal regulado, quedó en evidencia que altas concentraciones de oxígeno pueden ocasionar daño a los tejidos. En la actualidad sabemos que estos daños ocurren incluso con las concentraciones atmosféricas de oxígeno (Halliwell *et al.* 2006).

Descubrimiento de las ERO y su aceptación en los sistemas biológicos

Las especies reactivas fueron descritas a principios del Siglo XX por Gomberg y Paneth. En 1923 ambos demostraron la existencia de arreglos moleculares relativamente estables conteniendo un electrón desapareado en sus órbitas de valencia; estos correspondían a los radicales trifenilmetilo y alquilo y los denominaron radicales libres para diferenciarlos de los idénticos grupos moleculares que tienen todos sus electrones apareados (Boveris 2005).

En 1946, Leonor Michaelis propuso que la oxidación de todas la moléculas orgánicas bivalentes ocurre con la formación de un radical libre intermediario y demostró la reducción univalente y secuencial del oxígeno, describiéndolo como un mecanismo molecular de 4 pasos, en los que se transfiere un sólo electrón con la formación de radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, como intermediarios de la reducción del oxígeno y en agua como producto final de la reducción (Michaelis 1946).



Esta demostración no fue considerada verdadera para los sistemas biológicos hasta que se hizo el descubrimiento de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en 1969 por Mc-Cord y Fridovich, que la aislaron a partir de eritrocitos humanos. La existencia de la SOD implicó la existencia del radical superóxido. A partir de ese momento se descubrieron varios tipos de SOD y al mismo tiempo fue adquiriendo vigencia la propuesta de Fridovich, de que las enzimas SOD y catalasa constituyen

la defensa principal de las células aerobias contra la toxicidad del oxígeno. Las bacterias aerobias presentan tanto SOD como catalasa de forma constitutiva, mientras que las microaerofílicas solo presentan SOD y las anaerobias no tienen ninguna de las dos (McCord *et al.* 1971). Por otro lado, la diferencia que existe entre el sitio activo de la SOD de eucariontes y de bacterias, CuZnSOD y MnSOD respectivamente, fortaleció la teoría de la endosimbiosis, ya que las mitocondrias presentan MnSOD que es propia de bacterias (Grace 1990).

Formación de las ERO

Las ERO se forman por la reducción parcial del oxígeno. La molécula precursora de la mayoría de las ERO es el $O_2^{\cdot-}$, que al dismutarse espontáneamente o por la acción de la superóxido dismutasa, da origen a la formación de H_2O_2 y posteriormente al $\cdot OH$ en presencia de metales de transición (Liochev *et al.* 1999).

Camino de Beckman-Radi-Freeman

El radical hidroxilo se produce de diversas formas en las células. Puede provenir del peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), que se forma al combinar óxido nítrico ($\cdot NO$) y $O_2^{\cdot-}$, dando origen, al final de una serie de reacciones, al $\cdot OH$, entre otras especies reactivas como el dióxido de nitrógeno ($\cdot NO_2$) y el radical carbonato ($CO_3^{\cdot-}$). Esta vía se conoce como el camino de Beckman-Radi-Freeman (figura 1) (Radi *et al.* 2001).

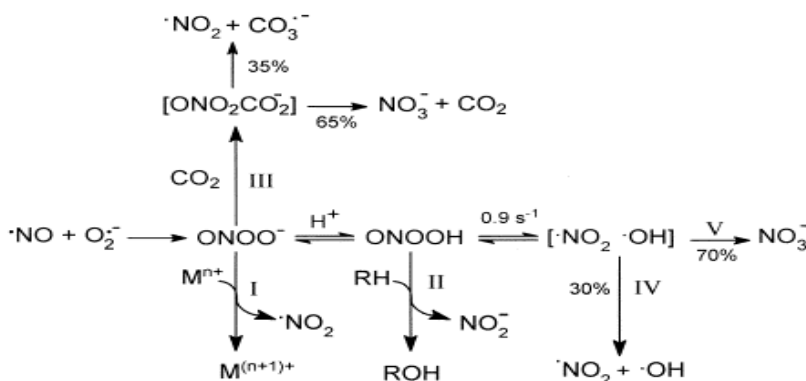


Figura 1. Rutas de reacción del peroxinitrito. Los números del I al V indican posibles destinos del peroxinitrito: I.- Las reacciones directas incluyen la oxidación de los centros de metales de transición, perdiendo un solo electrón (Fe, Mn, Cu); II.- La oxidación perdiendo 2 electrones y un sustrato objetivo (RH); III.- La formación de peroxocarbonilato nitroso, donde el 35% se descompone rápidamente en radicales secundarios. Y el peroxinitrito, que sufre homólisis a una tasa de $0.9 s^{-1}$ para dar origen a radicales libres en un 30% (IV) y otro 70% se convierte en nitrato (V). Tomado de (Radi, Peluffo *et al.* 2001) 11

Reacciones de Fenton

Se conoce otro mecanismo para la formación de HO^\bullet : las reacciones de Fenton. La formación del radical hidroxilo a partir de H_2O_2 en presencia de Fe^{2+} . El $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede liberar Fe^{3+} de la ferritina y también Fe^{2+} de los *clusters* de hierro-azufre y de este modo las reacciones de Fenton pueden continuar siempre que exista una fuente constante de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Hay controversia sobre si la reacción de Fenton con Fe^{2+} produce OH^\bullet directamente, o produce ión ferrilo que actúa como la especie intermediaria activa en la cual el hierro se encuentra en estado de oxidación IV. Incluso se propone una reacción en la cual no se genera ningún radical. Asimismo, se sugiere que se forman las tres especies químicas y que depende de con qué molécula se ha quelado el hierro y en qué proporción se encuentren, ya que el Fe^{2+} es quelado por ADP, EDTA y por ortofosfato. Además, no sólo hay controversia sobre cuál es la forma reactiva intermediaria, sino que también en los sistemas biológicos hay quienes debaten la importancia de esta vía de formación de ERO, basándose en que las reacciones de Fenton dependen de la concentración de H_2O_2 y de hierro libre, argumentan que en las células la concentración de H_2O_2 es baja y que la disponibilidad de metales de transición es limitada como para que ocurran las reacciones de Fenton, de modo que tengan importancia biológica (Barbusinski 2009). Por último, existe un puente entre el camino de Beckman-Radi-Freeman y las reacciones de Fenton, el atajo de Cadenas-Poderoso, en el cual se produce $\text{O}_2^{\bullet-}$ a partir de $\bullet\text{NO}$ y ONOO^- conducido por la ubiquinona.

Producción de ERO por la mitocondria

Uno de los orgánulos que produce $\text{O}_2^{\bullet-}$ en las células, son las mitocondrias (Barja 2007). En condiciones normales, la mitocondria es la principal aportadora de energía de la células eucariontes aerobias. La energía se produce mediante la cadena transportadora de electrones que va construyendo un gradiente de pH por el bombeo de protones al espacio intermembranal, utilizando la energía que se produce en una serie de reacciones redox por acción de los complejos I, III y IV. Este último reduce una molécula de O_2 , quedando como producto final el H_2O . Además el complejo II, a pesar de no ser una bomba de protones también contribuye de manera indirecta a la formación del gradiente electroquímico ya que, al transferir electrones del succinato a la ubiquinona, los pasa al complejo III el cual sí es una bomba de protones. El gradiente formado es utilizado por la $\text{F}_1\text{-F}_0$ ATP sintetasa en el proceso de fosforilación oxidativa, para formar ATP a partir del ADP y Pi (Madigan *et*

al. 2010). En todo este proceso ocurre también la formación de $O_2^{\cdot-}$. El potencial de reducción estándar desde oxígeno molecular hasta anión superóxido está alrededor de -0.16 volts (Wood 1987). Dentro de la mitocondria, se favorece la reducción, ya que es un ambiente muy reductor y los potenciales de reducción de varios componentes de la mitocondria van desde -0.32 hasta +0.39 volts (citocromo a3 en el complejo IV), haciendo termodinámicamente posible la reducción del oxígeno molecular con un sólo electrón (Cadenas *et al.* 2000). Algunas de las moléculas involucradas en la respiración capaces de transferir un electrón son las flavoproteínas, proteínas hierro-azufre y la ubisemiquinona. Al transferir un electrón al oxígeno molecular se producirá $O_2^{\cdot-}$, que posteriormente dará origen a peróxido de hidrógeno y a radicales hidroxilo. La mitocondria produce $O_2^{\cdot-}$ en cada uno de sus compartimientos, los complejos I, II, III y IV lo producen en la matriz mitocondrial y el complejo III también lo produce en el espacio intermembranal (Han *et al.* 2003). En la membrana externa la monoaminoxidasa produce peróxido de hidrógeno (figura 2); lo que en levaduras no ocurre, ya que no se ha detectado actividad de monoamín oxidasa (Bandlow 1972); sin embargo en el ser humano es una fuente importante de H_2O_2 .

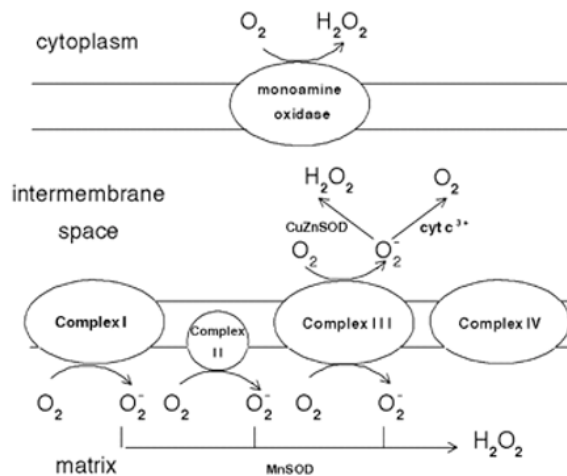


Figura 2. Sitios de formación de superóxido en la cadena transportadora de electrones de la mitocondria humana. Tomado de (Turrens 2003)

Factores que alteran la producción de ERO en las mitocondrias

La cantidad de $O_2^{\cdot-}$ producido en la mitocondria en la cadena transportadora depende de la cantidad de oxígeno; mientras más oxígeno esté presente más $O_2^{\cdot-}$ habrá de formarse y de la velocidad del transporte de electrones, mientras más lenta sea mayor cantidad de superóxido se produce (Turrens *et al.* 1982). Existen algunos inhibidores, como la rotenona que impiden el transporte de electrones desde el complejo I. Específicamente desde los centros Fe-S a la ubiquinona, evitando la formación del ubiquinol. La antimicina no permite el transporte de electrones desde el ubiquinol al citocromo c_1 dando como consecuencia que no se pueda oxidar el ubiquinol (frenando el ciclo Q y el transporte de electrones, dejando al resto de los complejos no inhibidos completamente reducidos, generando que el gradiente de H^+ se disipe). La reducción en la velocidad de la cadena transportadora también ocurre cuando los niveles de ADP son bajos o nulos (Boveris *et al.* 1972). En las mitocondrias, el complejo I es la principal fuente de ERO en el cerebro, mientras que en los pulmones y el corazón es el complejo III. Además, también depende del estado en el que la mitocondria se encuentre, si está respirando activamente como es en el estado 3 o si está totalmente reducida la cadena transportadora, como es en el estado 4 (Turrens 2003). Estas diferencias también varían dependiendo del sexo y el peso de los individuos. Se estima que una mujer de 60 kg puede producir de 120-320 mmol de $O_2^{\cdot-}$ cada día y un hombre de 80 kg 215-430 mmol de $O_2^{\cdot-}$, lo cual representa entre el 1% y 2% del oxígeno consumido durante el día (Cadenas *et al.* 2000).

Producción de las ERO en los peroxisomas

Los peroxisomas son también importantes en la aportación de ERO, especialmente en levaduras y plantas, en donde la β -oxidación de los ácidos grasos ocurre en los peroxisomas, a diferencia de mamíferos que ocurre en la mitocondria, además existe una diferencia crucial en la deshidrogenación inicial de la degradación de los ácidos grasos; donde una oxidasa de acil CoA transfiere los electrones al oxígeno molecular produciendo peróxido de hidrógeno en contraste de lo que ocurre en la mitocondria .

La producción de ERO en el peroxisoma de levaduras no se limita únicamente a la β -oxidación. También es producido por la oxidación de la lisina, ácido úrico y en la ruta metabólica para el metabolismo del metanol (esto sólo en el caso de las levaduras metilótrofas). Las levaduras

capaces de utilizar metanol usualmente poseen una alcohol oxidasa (AO) que, además de poder oxidar metanol, también pueden oxidar otros alcoholes alifáticos pequeños. La oxidación del metanol requiere oxígeno y produce como resultado H_2O_2 y formaldehído, seguida por la acción de la dihidroxiacetona sintasa (DHAS), que lo transforma en dihidroxiacetona y gliceraldehído-3-fosfato. Estas enzimas pueden llegar a estar en concentraciones muy elevadas y pueden hacer que el peroxisoma de las levaduras se vea cuadrado a causa de la formación de cristaloides de estas proteínas, ya que la AO y la DHAS pueden representar hasta el 70% de la proteína total (van der Klei *et al.* 2006).

Producción de ERO en el retículo endoplásmico

Cabe mencionar que el retículo endoplásmico también puede ser una fuente ERO, ya que es el sitio en donde se pliegan de forma correcta las proteínas y varias de estas requieren de la formación del enlace disulfuro, un plegado oxidativo. Este tipo de enlaces se forma por la acción de la maquinaria formadora de enlaces disulfuro (PDBFM, por sus siglas en inglés) y está formada por varias proteínas: Ero1p, Pdi1p, Mdi1p, Mdi2p y Eug1p. A las subunidades Pdi1p y Ero1p se les transfieren electrones y el oxígeno es el aceptor final de éstos. Así es como se ha propuesto que el producto final es H_2O_2 (Sevier *et al.* 2002; Tu *et al.* 2004). A pesar de que no existe evidencia *in vivo*, los experimentos *in vitro* con Ero1p demuestran la formación de H_2O_2 por cada enlace disulfuro formado (Gross *et al.* 2006). Aunado a esto, cuando el retículo endoplásmico se encuentra bajo una situación de estrés, se desata la respuesta a proteínas desdobladas (UPR, por sus siglas en inglés). En *S. cerevisiae* el estrés provocado por la acumulación de proteínas mal dobladas desata la UPR y esto correlaciona directamente con un incremento en la producción de ERO por la mitocondria y por la PDBFM (Haynes *et al.* 2004). El responsable de inducir esta producción de ERO en la mitocondria sería el Ca^{2+} liberado por el retículo endoplásmico (Pozniakovsky *et al.* 2005)

La familia NOX

Otra fuente de producción de $O_2^{\cdot-}$, es la familia de proteínas NOX. Esta familia de proteínas lleva a cabo la transferencia de electrones a partir de NADPH a través de dos grupos hemo al oxígeno molecular, generando anión superóxido. Todas la proteínas de la familia NOX tienen 6 dominios transmembranales, dominios de unión a FAD y a NADPH, histidinas apareadas que unen los grupos hemo ubicados dentro de la membrana. Algunas de estas proteínas son reguladas por

calcio, específicamente NOX5, Duox 1 y Duox2. El resto de ellas (NOX 1, 2, 3 y 4) son reguladas positivamente con p22hox (Nauseef 2008).

Se ha demostrado la existencia de la familia NOX en los tejidos de organismos multicelulares, desde plantas hasta animales, también se ha demostrado en microorganismos unicelulares (Nauseef 2008)

Con todo lo anterior, se puede concluir que la generación de las ERO en la célula es un proceso en donde los organelos responden de forma individual, pero las consecuencias se esparcen a todos los otros compartimentos cuando no existe una regulación correcta de las ERO u otros procesos. Mantener las concentraciones de ERO en niveles adecuados es crucial para el buen funcionamiento celular y es un proceso intrincado, que para alcanzar a comprender se requiere tanto de una visión a nivel molecular como a nivel celular y todos los niveles comprendidos entre éstos. Además hay muchas más fuentes de las ERO que no están descritas en los párrafos superiores, sólo se presentan las más importantes.

Estrés oxidante

En 1985 se definió el estrés oxidante como “la perturbación del equilibrio entre antioxidantes y pro-oxidantes, a favor de los últimos” (Sies 1985). Esta definición se apoya a su vez en otros dos conceptos más, el de oxidación y el de antioxidantes. La oxidación es la pérdida de electrones, la substracción de hidrógeno o la ganancia de oxígeno. Mientras que de forma coloquial, se define a un antioxidante como una sustancia que evita la oxidación de un sustrato, aun cuando ésta se encuentre en bajas concentraciones (Halliwell *et al.* 2006).

La definición dada en 1985 fue importante para impulsar la investigación en torno al tema; sin embargo los resultados de las investigaciones hicieron necesaria una nueva y más completa definición, ya que los datos sobre regulación vía reacciones redox, marcadores de estrés oxidante y la función de los antioxidantes en varios aspectos, llevaron a que se formulara una nueva definición. La propuesta dada es que el estrés oxidante es la disrupción de las vías reguladas por reacciones redox y su control (Jones 2006). Esta propuesta surge a partir de que en varios experimentos se reportó un incremento en la concentración de las ERO sin perturbar los principales sistemas antioxidantes de las células. En un experimento donde se sobreexpresó gp91^{phox} homólogo de Nox2 y produce H₂O₂ de manera constitutiva- acoplado a un gen reportero, se determinó el contenido de

peróxido de hidrógeno con diclorofluoresceína. El resultado fue que sí incrementó la concentración de peróxido de hidrógeno pero tanto el glutatión como las tiorredoxinas, permanecieron inalterados (Go *et al.* 2004). En cambio el peróxido de hidrógeno agregado extracelularmente sí provoca la oxidación del glutatión y de las tiorredoxinas (Watson *et al.* 2003). Además la compartimentalización de las reacciones redox de señalización está muy controlada. En un experimento en donde se indujo la producción de ERO, usando EGF como inductor en queratinocitos se encontró que sólo la Trx1 del citosol se oxidaba, mientras que en el resto de los compartimentos esto no ocurrió. Además, existen numerosos casos de tratamientos médicos, en donde se ha probado que la administración de antioxidantes no promueve una mejoría, evidenciando que sólo el concepto de desequilibrio entre anti-oxidantes y pro-oxidantes falla en aliviar el estrés oxidativo en algunas enfermedades (de Andrade *et al.* 2012; Ferreira *et al.* 2012; Gu *et al.* 2012).

Las ERO y el daño celular

Las ERO pueden dañar un amplio espectro de moléculas, incluyendo los ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. Además, son capaces de iniciar la vía apoptótica. Se ha demostrado que ya sea por envejecimiento cronológico o replicativo, las levaduras acumulan las ERO y como consecuencia, se activa el programa de muerte celular programada (Longo *et al.* 2005). Varios tipos de estrés pueden conducir a la apoptosis: El estrés con NaCl, ácido acético, hipoclorito, glucosa en ausencia de otros nutrientes y también algunas moléculas como la osmotina, que es un péptido que producen las plantas para defenderse de hongos patógenos, HOCl, la aspirina, dependiendo de la fuente de carbono y la adozelesina, son algunas de las moléculas que llevan a la apoptosis (Madeo *et al.* 2004). Lo importante de todo esto es que en todos los casos se observa una producción concomitante de las ERO.

Daños al DNA por las ERO

Las ERO dañan el DNA. Este daño puede ser en la base o en el azúcar. El daño en el azúcar lleva a su fragmentación, a la pérdida de la base y a roturas en una sola hebra del DNA con una azúcar terminal fragmentada. El ataque a las bases por el H₂O₂, tiene como resultado timinas con el anillo saturado, hidroximetil-uracilo, fragmentos de timina y adeninas con el anillo abierto (Imlay *et al.* 1988). La consecuencia del daño al DNA en las levaduras es la degradación de Cdc6 en el proteosoma, dependiendo de la ubiquitinación. Cdc6p es indispensable para el inicio de la

replicación y para mantener la sincronía de la replicación y la mitosis (Blanchard *et al.* 2002). También se ha observado el efecto de la disrupción de Cdc13p, que es una proteína que se une a los telómeros en levaduras, y su cancelación provoca telómeros con longitudes anormales, la activación de MEC1, que es un punto de control que se activa cuando existe daño al DNA, y la apoptosis (Qi *et al.* 2003).

Daños a proteínas por las ERO

Cuando se trata del daño a proteínas, lo más común es la oxidación de los grupos tiol, que resulta en la formación de enlaces disulfuro, la formación de ácido sulfénico sulfínico y sulfona que tiene como consecuencia el mal funcionamiento de algunas proteínas. Esto ocurre cuando las ERO están en niveles en los que se considera estrés. También existen algunas proteínas que se regulan con el H₂O₂ de manera natural, siempre y cuando las células estén en condiciones aeróbicas normales (Perrone *et al.* 2008). Un ejemplo en *S. cerevisiae*, es la actina, que es blanco de las ERO, los residuos aminoácidos 285 y 374, ambos de Cys, son oxidables por H₂O₂. La célula tiene un par de enzimas implicadas en evitar la formación de este enlace disulfuro en la actina: Oye2p y una óxidorreductasa dependiente de NADPH. Mutantes oye2 muestran mayor acumulación de las ERO, fragmentación de DNA y envejecimiento prematuro (Perrone *et al.* 2008).

Daños a los lípidos y su peroxidación

De manera general, los lípidos al ser atacados por las ERO, producen peróxido, razón por la que esta reacción se denomina lipoperoxidación. El primer paso es la iniciación, en donde un radical abstrae un átomo de hidrógeno a un ácido graso, formando un ácido graso radical y esto en presencia de oxígeno molecular, produce un ácido graso peroxirradical que sustrae otro electrón de otro ácido graso, transformándolo en lipoperóxido y un ácido graso radical, propagándose de este modo la reacción. La propagación cesa cuando un radical reacciona con otro formando una especie no reactiva y a esta fase se le conoce como terminación. Las membranas celulares son ricas en lípidos que son susceptibles al ataque de las ERO, mientras más insaturaciones tengan los ácidos grasos son más vulnerables. Estas reacciones provocan daño a las membranas de las células reduciendo su fluidez y esto se ha asociado al envejecimiento (Pratico 2002).

Funciones de las ERO

Aun cuando las ERO son mejor conocidas por los daños que provocan, son indispensables, debido a que favorecen el buen funcionamiento de los sistemas biológicos. Tienen funciones durante el desarrollo, en la señalización, en la defensa contra patógenos, en la síntesis de biomoléculas de importancia, etc.

El H_2O_2 es fundamental para la fagocitosis, en donde se produce peróxido por la acción de las NADPH oxidasas. Además, las proteínas NOX3-p22^{phox} junto con NOXO1, son esenciales para el desarrollo del oído interno en mamíferos y la ausencia de cualquiera de ellas produce un desarrollo anormal (Paffenholz *et al.* 2004; Kiss *et al.* 2006). También son cruciales en la iodación de la hormona tiroidea y mutaciones en Duox1 ó 2 son responsables de algunos tipos de hipertiroidismo (Moreno *et al.* 2007). Además, Duox es imprescindible en la mucosa nasal, ya que es importante para mantener al sistema antimicrobial de la lactoperoxidasa- H_2O_2 - tiocianato. La deficiencia en Duox ocasiona infecciones recurrentes en pacientes con fibrosis quística (Fragoso *et al.* 2004). La familia de proteínas NOX interviene en la tensión vascular, en el favorecimiento de la angiogénesis, en el crecimiento vascular y detectan la tensión de oxígeno en el ambiente (Cave *et al.* 2006).

Se han descrito varios sistemas que están regulados directamente el H_2O_2 o que de manera indirecta, desencadenan respuestas. Un ejemplo de regulación indirecta son las catalasas, las cuales se sugiere pueden ser reguladas por fosforilación de tirosinas, provocando un perfil diferencial en su actividad. De manera más específica, las cinasas c-Abl y Arg se asocian a la fosforilación de los residuos de Tyr en las catalasas, que se activan con bajos niveles de peróxido y al fosforilarlas se incrementa su actividad (Cao *et al.* 2003), pero cuando el nivel de peróxido es muy elevado, estas cinasas se disocian de la catalasa y provocan, ya sea por su desfosforilación o por su ubiquitinación, una pérdida de actividad, que al final promueve la entrada en la vía apoptótica (Cao *et al.* 2003; Cao *et al.* 2003). Como que la exposición a diferentes niveles de peróxido provoca patrones diferentes en la sumolilación (proceso similar a la ubiquitinación, regula la actividad de las proteínas) (Bossis *et al.* 2006), p53 activa o reprime diferentes genes, depende también de la cantidad del peróxido (Sablina *et al.* 2005). Otro mecanismo regulado por peróxido de hidrógeno de forma directa es la inactivación con la oxidación en una de las cisteínas catalíticas de las típicas 2-Cys peroxirredoxinas de mamíferos. Esta oxidación aparentemente irreversible, no lo es ya que en levaduras se demostró que una enzima, la sulfirredoxina, revierte la oxidación. Además de las

sulfirredoxinas, los mamíferos también tienen estresinas, que son reguladas por peróxido de hidrógeno. Esto hace notable lo complejo que puede ser la regulación por peróxido, ya que la misma molécula interviene en diferentes niveles de regulación y con un espectro muy amplio de moléculas (Rabilloud *et al.* 2002; Wagner *et al.* 2002).

La respuesta al estrés oxidante es un caso de regulación con el H_2O_2 . En *Schizosaccharomyces pombe* el factor de transcripción Pap1p es responsable de la respuesta a niveles bajos de peróxido, se activa por la oxidación de residuos de cisteína dependiente de la forma activa de la tiorredoxin peroxidasa Tpx1p y provoca que el factor se acumule en el núcleo. Tpx1p, de manera similar a Pap1p se regula por la oxidación de residuos de cisteína con el H_2O_2 pero, a diferencia de Pap1p, ésta es reprimida y sólo se oxidan los residuos de cisteína en altas concentraciones de peróxido de hidrógeno. De este modo, se genera un mecanismo en el que a altas concentraciones de peróxido se inhibe la oxidación de Pap1 y al mismo tiempo se promueve la acumulación del H_2O_2 , lo que estimula la activación de los factores Sty1/Atf1 y la activación de genes, que responden a concentraciones altas de H_2O_2 . Asimismo, la sulfirredoxina Srx1p es responsable de la reversión de la oxidación de Tpx1p además de los niveles del H_2O_2 . Todas estas moléculas se encargan de una respuesta precisa y regulada entre dos vías distintas y Tpx1p actúa como un sensor, activador y represor (Bozonet *et al.* 2005).

Yap1p pertenece a una subfamilia de factores de transcripción tipo AP-1. Yap1p es importante en la regulación de genes inducidos por estrés oxidante en *S. cerevisiae*, junto con Msn2,4p (Gasch *et al.* 2000) y uno de los genes que activa es ScCTT1 (la catalasa). Al igual que en *S. pombe*, este factor se encuentra en el citoplasma mientras está reducido, como consecuencia del transportador Cmr-1, que lo exporta activamente desde el núcleo al citoplasma, provocando su acumulación en este último. La oxidación de Yap1p es dependiente de Gpx3p y de Ybp1p. Ybp1p forma un complejo con Yap1p y permite la oxidación dependiente de Gpx3p. En su forma oxidada Yap1p no puede interactuar con el transportador Cmr-1 y se comienza a acumular en el núcleo induciendo la transcripción de genes de respuesta a estrés oxidativo (Delaunay *et al.* 2000).

En bacterias, un mecanismo con mucho potencial biotecnológico es el factor de transcripción OxyR, el cual se oxida directamente con el H_2O_2 , y se une al DNA tanto en la forma oxidada como en la forma reducida; sin embargo, sólo la forma oxidada induce la transcripción de genes relacionados al estrés oxidativo (Storz *et al.* 1990). Este factor es reciclable, ya que puede volver a

su forma inactiva por la acción de la glutarredoxina1 y es quizá el mejor estudiado en bacterias (Zheng *et al.* 1998).

De todos los ejemplos mencionados de oxidación en residuos clave, su reducción siempre es posible. Para el caso del factor de represión transcripcional PerR de *Bacillus subtilis*, la oxidación es aparentemente irreversible. Se oxida en residuos de histidina y es dependiente de la concentración de Fe^{2+} (Lee *et al.* 2006). En su forma oxidada no reprime la transcripción de genes como el de la catalasa cuando está activo, es decir en su forma reducida sí mantiene la represión (Herbig *et al.* 2001). Es importante mencionar la dependencia del Fe^{2+} en la inactivación de este represor en conjunto con las concentraciones de H_2O_2 , ya que parece estar regulándose por el peróxido producido en las reacciones de Fenton (Veal *et al.* 2007).

Se propone que las ERO han sido importantes en la evolución de los organismos, en general construyendo el proceso, ya que existe una relación costo-beneficio. Un ejemplo de esto es el caso de la hipótesis de tasa de vida, que propone que si la tasa metabólica es alta, entonces hay un rápido crecimiento y un mejor desarrollo; pero al costo de un envejecimiento rápido provocado por una mayor producción de las ERO y por lo tanto, una muerte temprana (en otras palabras “vive rápido, muere joven”) (Pearl 2011). Existen también teorías en las que las coloraciones vistosas que resultan atractivas a las hembras son sensibles a daño por las ERO, siendo así indicativo de la capacidad detoxificante del macho. Es importante mencionar que también los espermatozoides son sensibles al daño por las ERO, porque en las membranas poseen muchos ácidos grasos con insaturaciones, haciéndolos sensibles a la peroxidación (Dowling *et al.* 2009).

Mecanismos antioxidantes

Todos los organismos aeróbicos han desarrollado mecanismos para evitar la formación de las ERO además de que también existen vías para eliminar las ERO formadas. Existen una gran cantidad de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que llevan a las ERO a formas menos reactivas.

Canales mitocondriales inespecíficos

En levaduras se ha detectado la presencia de canales mitocondriales no específicos (MUC por sus siglas en inglés): s_c MUC (Prieto *et al.* 1992) y D_h MUC (Cabrera-Orefice *et al.* 2010) para S.

cerevisiae y para *D. hansenii*, respectivamente. Los MUC al abrirse generan la pérdida del gradiente electroquímico, de modo que se favorece la tasa de consumo de oxígeno y por ende se reduce la cantidad de ERO producida (Korshunov *et al.* 1997). En *S. cerevisiae* estos canales se abren en presencia de ATP y se cierran cuando existe ADP y fósforo inorgánico, fosfato o niveles bajos de ATP (Prieto *et al.* 1995). En *D. hansenii* la respuesta es similar, pero requieren 10 veces más fósforo inorgánico que los de *S. cerevisiae* para cerrarse. Además, los iones monovalentes como el Na⁺ y el K⁺ promueven el cierre de los MUC en *D. hansenii*, mientras que en *S. cerevisiae* inducen la transición de la permeabilidad mitocondrial y como consecuencia la pérdida del gradiente electroquímico y la disminución de la síntesis de ATP (Cabrera-Orefice *et al.* 2010).

Proteínas desacoplantes

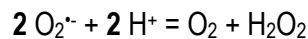
Hay también ejemplos de proteínas desacoplantes (UCP por sus siglas en inglés) en mamíferos, que difieren de las MUC en que no inducen la transición de permeabilidad mitocondrial, sino que sólo disipan el gradiente de protones. UCP1 es una proteína desacoplante que se encuentra en la membrana interna de los adipocitos cafés y su papel fisiológico es generar calor mediante el flujo de protones. Existen también UCP2 y UCP3, que también provocan el flujo de protones y pueden estar funcionando para regular la cantidad de O₂⁻ producido. Además UCP2 parece tener un papel importante en la diabetes tipo 2 (Krauss *et al.* 2005). Se ha detectado actividad de proteínas desacoplantes en una gran variedad de organismos. El expresar estas proteínas confiere una mayor resistencia a las ERO exógenas (Kowaltowski *et al.* 1998), posiblemente gracias a que la producción endógena esté bajo control y las enzimas de detoxificación estén disponibles para lidiar con las ERO exógenas (Krauss *et al.* 2005). En un experimento con cepas de *Candida albicans* desprovistas de proteínas desacoplantes, se analizó qué tan invasivas eran con respecto a la cepa silvestre. Las mutantes resultaron ser menos invasivas (Cavalheiro *et al.* 2004), lo cual fortalece su importancia contra las ERO. Por último, en *Yarrowia lipolytica* se identificó una actividad de UCP similar a la de UCP1 de los adipocitos cafés (Luevano-Martinez *et al.* 2010). Después de un estudio filogenético, se identificó al transportador de oxaloacetato mitocondrial como ortólogo a UCP1, que lleva a cabo ambas funciones, tanto de UCP como transportando sulfato/oxaloacetato. Esta proteína se expresa más en la fase de crecimiento estacionaria, probablemente debido al hecho de que se requiere una alta tasa de consumo de oxígeno en ausencia de la síntesis de ATP para evitar la formación del superóxido (Guerrero-Castillo *et al.* 2011).

Cadenas ramificadas transportadoras de electrones

Existen también variantes en las cadenas transportadoras de electrones, en las cuales las enzimas redox de una subunidad que no bombea protones conduce a los electrones. Esto, al igual que todos los mecanismos anteriores, previene la formación del gradiente de H⁺ y acelera el consumo de oxígeno, con la diferencia de que no es necesario disiparlo, sólo se evita la formación del gradiente. En las mitocondrias, las más comunes de estas proteínas son las oxidasas alternativas (AOX por sus siglas en inglés) y las NADH deshidrogenasas de tipo II (NDH2). Las NDH2 se encuentran tanto en la parte interna de la membrana mitocondrial como en la parte externa: mientras una oxida al NADH de la matriz mitocondrial la otra lo oxida del citosol y no bombean protones al hacer el transporte de electrones (Fisher *et al.* 2007). Las AOX regeneran la ubiquinona y transfieren los electrones al oxígeno para formar agua sin sacar protones al espacio intermembranal. Existen levaduras que cuentan con isoformas de AOX, unas son constitutivas mientras que el resto sólo se inducen bajo condiciones de estrés (Guerrero-Castillo *et al.* 2011).

Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD) (McCord *et al.* 1969) es una enzima clave en la detoxificación de ERO en *S. cerevisiae*, ya que descompone al radical superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular:



Se han descrito varios tipos de SOD. En la mitocondria se encuentra una forma específica de SOD con manganeso en el sitio activo, MnSOD. En el espacio intermembranal está la CuZn SOD que contiene cobre y zinc en el sitio activo (Fridovich 1995). La ausencia de alguna de las SOD o de ambas, reduce la viabilidad de los cultivos de *S. cerevisiae* (Longo *et al.* 1996).

Glutatión

El glutatión es un compuesto de tres aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina, los cuales están unidos de forma lineal mediante un enlace peptídico γ y un enlace peptídico α , respectivamente. Si en el residuo de cisteína se encuentra un grupo sulfhidrilo (R-SH), entonces es glutatión reducido (GSH). El glutatión reducido sirve como donador de electrones para reducir

peróxido con ayuda de la glutatión peroxidasa, o también para reducir enlaces disulfuro catalizado por las glutarredoxinas (Appenzeller-Herzog 2011). Puede reaccionar también de forma no enzimática con varios oxidantes, pero con una cinética muy baja (Winterbourn *et al.* 1999). El producto de estas reacciones es glutatión oxidado (GSSG), un homodímero unido mediante un enlace disulfuro.

Debido a que la concentración del glutatión está en el rango milimolar (Hwang *et al.* 1992), es considerado un amortiguador del estado redox de la células, y sólo una pequeña parte del glutatión se encuentra asociado a proteínas (Hansen *et al.* 2009).

Glutatión peroxidasa

La glutatión peroxidasa (GPx) descompone el H₂O₂. Se conocen dos formas: la cGPx y la PHGPx; la primera es la glutatión peroxidasa clásica y la segunda está asociada a las membranas lipídicas y reacciona con los fosfolipohidroperóxidos formados por la lipoperoxidación. Ambas GPx disponen del GSH con el cual reducen H₂O₂ y otras formas de hidroperóxidos, por ejemplo, los producidos por la peroxidación y dejan el glutatión en su forma oxidada (GSSG).



En *S. cerevisiae* se habían descrito tres glutatión peroxidasas: GPX1, GPX2 y GPX3, pero a partir de una reexaminación se determinó que son PHGPx's. Una triple mutante creciendo en medio con linolenato, que es un ácido graso rico en insaturaciones y muy susceptible a la peroxidación, no fue capaz de crecer ya que el linolenato se incorporó a las membranas lipídicas (Avery *et al.* 2001).

Tiorredoxinas

Las tiorredoxinas fueron descubiertas hace 48 años como un agente reductor de la ribonucleótido reductasa (RNR) (Laurent *et al.* 1964). Una de sus funciones también es la reducción de peróxido de hidrógeno y se ha reportado que las mutantes de *S. cerevisiae* sin ninguna glutarredoxina ni tiorredoxina no son viables (Draculic *et al.* 2000). En esta levadura, la eliminación de las tiorredoxinas citoplasmáticas (TRX1 y TRX2) provoca una reducción del 33% en el tiempo de duplicación, debido al alargamiento de la fase S del ciclo celular a causa de no poder reducir la RNR. Además se vuelven auxótrofas para metionina e incrementan su tamaño (Muller 1991).

Las catalasas

En 1937 se cristalizó por primera vez la catalasa de hígado bovino, siendo una de las primeras cristalizaciones de proteínas intracelulares exitosas (Sumner, J.B. & Dounce, 1937). Las catalasas se encuentran ampliamente distribuidas y es posible encontrarlas en los tres dominios; eucariontes, procariontes y arqueas (Díaz *et al.* 2005). No todas las catalasas son iguales; así, las catalasas de manganeso se han reportado únicamente en procariontes (Vainshtein *et al.* 1986), las catalasas peroxidadas se encuentran tanto en procariontes como en eucariontes (Vainshtein *et al.* 1986) y las llamadas verdaderas catalasas, que poseen el grupo hemo, son homotetrámeros que se encuentran únicamente en eucariontes (Klotz *et al.* 1997).

Son enzimas que llevan a cabo la dismutación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), resultando como productos oxígeno molecular (O_2) y agua (H_2O). Esta reacción se lleva a cabo en dos pasos: el primero es la oxidación del hierro III del grupo hemo, quedando un grupo ferroxilo con hierro IV y un radical catiónico porfirínico. En este primer paso se libera una molécula de agua, estado intermediario que es llamado compuesto 1. El siguiente paso consiste en la reducción del compuesto 1 por una segunda molécula de H_2O_2 , formando O_2 y H_2O (Díaz 2003). Es posible que a partir del compuesto 1 se forme el compuesto 2, que se produce por la reducción del compuesto 1 dejando Fe(IV). Si este después reacciona con una molécula de H_2O_2 , se formará el compuesto 3, donde el estado de oxidación del hierro es Fe(VI). Estos compuestos se forman en tasas muy bajas y algunas catalasas prácticamente nunca forman estos compuestos (Lardinois *et al.* 1994).

En el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* existen 2 genes que codifican para catalasas: el gen *CTA1* codifica para la catalasa A (Cohen *et al.* 1985) y el gen *CTT1* que codifica para la catalasa T (Spevak *et al.* 1983). El gen *YDR256C* o *CTA1* se ubica en el cromosoma IV entre las bases 969,680 a 968,133. Codifica para una proteína con 515 aminoácidos, que tiene un punto isoeléctrico de 7.46 y un peso molecular de 58.555 KDa. El gen *YGR088W* o *CTT1*, se ubica en el cromosoma VII entre las bases 654,634 a 656,322 y codifica para una proteína con 562 aminoácidos, con un punto isoeléctrico de 6.51 y un peso molecular de 64.583 KDa (Cherry *et al.* 2011). Ambas enzimas se agrupan en la familia de las hemocatalasas monofuncionales (Gough *et al.* 2001). Son agrupadas dentro de las catalasas monofuncionales, porque no son capaces de reducir el compuesto 1 a partir de algún agente reductor externo, como el NADH. Además, dentro de las catalasas monofuncionales existen las catalasas grandes, que pesan más de 80KDa, tienen una

región tipo flavodoxina en el amino terminal y no tienen dominios de unión a NADPH, a diferencia de las pequeñas que sí lo unen, no tienen un dominio tipo flavodoxina y están alrededor de los 60KDa; por lo tanto, las dos catalasas de *S. cerevisiae* corresponden a catalasas monofuncionales pequeñas. Del mismo modo, *Debaryomyces hansenii* tiene dos catalasas: DEHA2F10582g o *DhCTA1* que tiene 486 a.a y DEHA2B16214g ó *DhCTT1* que codifica para 558 a.a (Sherman *et al.* 2009), identificadas por su similitud con las de *S. cerevisiae*. Por su peso molecular, las catalasas de *D. hansenii* también corresponden a las catalasas monofuncionales pequeñas.

Debaryomyces hansenii

Las células del género *Debaryomyces* se reproducen vegetativamente por gemación lateral. La reproducción sexual procede por recombinación heterógama. Esta conjugación lleva a una pequeña fase diploide, después a la mitosis y finalmente a la formación de ascosporas (Forrest *et al.* 1987). El género se caracteriza por la poca capacidad de fermentar y algunas especies no fermentan en lo absoluto. También son incapaces de asimilar nitrato y expresan la coenzima Q-9 (Kurtzman *et al.* 1998).

Dentro del género *Debaryomyces* se encuentra *D. hansenii*, de la cual existen dos variedades descritas: *Debaryomyces hansenii* var *hansenii* y *Debaryomyces hansenii* var *fabryi*. Entre ellas existen diferencias en la secuencia del 26S rRNA, en la temperatura de crecimiento y en la migración electroforética de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Estas características han sido utilizadas para diferenciar entre las dos variedades (Nakase *et al.* 1985).

La temperatura óptima de crecimiento de *D. hansenii* es de 20-25°C, pero es capaz de crecer a menos de 0°C, por lo que se le considera criotolerante (Davenport 1980). Además, es capaz de utilizar una gran variedad de sustratos como fuente de carbono. La fermentación de la glucosa es pobre al igual que la fermentación de galactosa, maltosa, rafinosa y trehalosa, lo que es consistente con el hecho de que crece pobremente en condiciones de anaerobiosis (Nakase *et al.* 1998).

Debaryomyces hansenii es una levadura halotolerante, se encuentra en ambientes hipersalinos, como las salinas de la costa del atlántico en Namibia y en el gran lago de sal de Utah. Cabe resaltar que puede ser cultivada en medio conteniendo hasta 25% de NaCl (Butinar *et al.* 2005). Una de las estrategias que utilizan los organismos para mantener el balance osmótico es la síntesis de solutos compatibles (Brown *et al.* 1972). En los hongos, los principales solutos son glicerol, manitol y

arabinitol, que son utilizados para mantener el potencial osmótico y poder sobrevivir y crecer (Jennings 1993). En *D. hansenii* el glicerol es el principal soluto en el crecimiento exponencial (Nobre *et al.* 1985), pero en el crecimiento estacionario lo es el arabinitol (Larsson *et al.* 1987).

D. hansenii además es oleaginosa, lo que significa que puede acumular una gran cantidad de lípidos. Es capaz de acumular hasta un 70% de su peso seco en lípidos. Esta es una capacidad inusual entre las levaduras, ya que sólo 30 de 600 especies lo logran hacer (0.05%) (Ratledge 2002). Posee un 67% de fosfolípidos y un 33% de otros lípidos, la mayor parte de los fosfolípidos son fosfatidilcolina, seguido por fosfatidil inositol, fosfatidiletanolamida, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y cardiolipina y el resto de los lípidos son compuestos de triacilgliceroles (Merdinger *et al.* 1965).

Se han encontrado plásmidos lineales en *D. hansenii* denominados pDHL1 (8.4Kb), pDHL2 (9.2Kb) y pDHL3 (15Kb); la presencia de estos plásmidos se ha relacionado con la presión osmótica, ya que se pierden cuando las células son crecidas en medio sin NaCl y se mantienen en medios con NaCl, glicerol y sorbitol. (Gunge *et al.* 1993). Otro grupo de investigación liga la estabilidad de estos plásmidos a la temperatura, ya que creciendo a 25°C y sin presión osmótica se conservan; sin embargo en el rango de temperatura que va de los 30-35°C se pierden gradualmente. Por otro lado, esta levadura puede tolerar y sintetizar toxinas. En un principio la producción de toxina se asoció al plásmido pDHL1, pero posteriormente se demostró que era de origen cromosómico (Fukuda *et al.* 1997). Las toxinas sintetizadas son capaces de matar a varias especies de levaduras (Gunge *et al.* 1993). Su actividad se incrementa en medio con NaCl (Llorente *et al.* 1997) y se han investigado las condiciones para producirla en mayor concentración (Marquina *et al.* 2001).

D. hansenii tiene un uso de codones diferente, ya que el codón CUG, que usualmente codifica para leucina, en esta levadura codifica para serina, el cual es leído por un tRNA adicional. Esto también ocurre en 10 especies de *Candida* (Sugita *et al.* 1999). Es de hacer notar que *D. hansenii* posee 43 tRNA y tiene un total de 205 genes que codifican para los tRNA (Dujon *et al.* 2004). Además, es una de las levaduras con mayor capacidad codificante, con el 79% del genoma y con 6,906 marcos abiertos de lectura. También es la levadura con el genoma más redundante. Tiene una redundancia total de 49.2% comparado con el de *S. cerevisiae* que es de 40% (Llorente *et al.* 2000).

Debaryomyces hansenii tiene dos catalasas, *DhCTT1* y *DhCTA1*, que tienen un perfil diferente de activación, el cual depende de la fuente de carbono. Para el caso de *DhCTA1*, la actividad enzimática es mayor con fuentes de carbono no fermentables, como lo es el etanol. Para la *DhCTT1* la actividad es mayor con fuentes fermentables como la glucosa. *D. hansenii* resiste mayores concentraciones de peróxido de hidrógeno que *S. cerevisiae*, debido a que tiene una mayor actividad de catalasa (Segal-Kischinevzky *et al.* 2011).

JUSTIFICACIÓN

El laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias de la UNAM (Segal-Kischinevzky *et al.* 2011) reportó que la actividad de catalasa total (sin distinguir entre el aporte de la CTT ó CTA) es más alta en *D. hansenii* que en *S. cerevisiae* en medio rico YPD con y sin sal, tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria de crecimiento.

Para determinar cuál catalasa de *D. hansenii* se encuentra presentes bajo diferentes condiciones de cultivo, Segal y colaboradores analizaron la actividad mediante zimogramas. Se encontró que la actividad de catalasa T es mayor en medio YPD en crecimiento estacionario. En otras condiciones, como en YP etanol, ya sea en crecimiento exponencial o estacionario, la actividad de catalasa T no es detectable. En esas condiciones, prevalece la catalasa A.

Para complementar este análisis, se obtuvo el RNA de las diferentes condiciones y se analizó mediante hibridación tipo Northern. Los resultados indicaron que el mRNA de *DhCTT1* está presente tanto en fase exponencial como en fase estacionaria de cultivo, en el medio YPD y YPD NaCl 0.6M, lo que sugiere que hay una regulación de estas enzimas a nivel post-traducciona.

Con el fin de conocer si las catalasas de *D. hansenii* son capaces de proporcionar ventajas en la utilización de diversas fuentes de carbono y en la capacidad de tolerar la presencia de NaCl, se planteó la construcción de un plásmido con el gen *DhCTA1* y otro plásmido con el gen *DhCTT1*, para transformarlos en una cepa acatalasémica de *S. cerevisiae*. Se evaluó el crecimiento en diversos medios y la actividad específica de las cepas complementadas de manera heteróloga. El plásmido con el gen *DhCTA1* fue construido por Diego Noriega (Tesis de Licenciatura en Biología, F. Ciencias, UNAM, 2012). Su expresión confirmó una ventaja en la velocidad de duplicación de las cepas transformantes. Los resultados de la construcción del plásmido con el gen *DhCTT1* se presentan en esta tesis.

Se analiza la importancia de la catalasa T de *D. hansenii* en la tolerancia al estrés oxidante generado por las vías anabólicas y catabólicas, a partir de la utilización de la glucosa como fuente de carbono en una mutante acatalasémica de *S. cerevisiae*. Su contribución en la detoxificación del H₂O₂ podría tener efectos benéficos generales, debido a que el daño ocasionado por esta especie química, como está descrito en la introducción, es general.

Cabe resaltar que las ERO fuera de control son la causa de diversas enfermedades y del envejecimiento celular. El conocimiento generado acerca de estos temas tiene relevancia médica.

OBJETIVOS

Objetivo general

Complementar una mutante acatalasémica de *Saccharomyces cerevisiae* con el gen *DhCTT1*, que codifica a la catalasa citoplasmática de *Debaryomyces hansenii*.

Objetivos particulares

Analizar de forma cualitativa la expresión de *DhCTT1* en una mutante acatalasémica de *Saccharomyces cerevisiae*.

Medir y comparar la actividad específica de catalasa entre las distintas cepas mutantes de *S. cerevisiae*, las transformantes y *D. hansenii*.

Analizar mediante la búsqueda de sitios de unión a factores de transcripción en las secuencias 5' río arriba para determinar el funcionamiento del promotor de *D. hansenii* en *S. cerevisiae* y su posible regulación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas

La cepa de *S. cerevisiae* acatalasémica se originó de la cruce de las cepas Y13615 (BY4742; Mata; his3D1; leu2D0; met15D0; Ura3D0, YDR256c::KanMX4) Δ cta1 y Y04718 (BY4741; Mat α ;his3D1;leu2D0;met15D0;ura3D0;YGR088w::KanMX4) Δ ctt1. Estas cepas tienen auxotrofías para histidina, metionina, uracilo y leucina y una inserción (KanMX4) que entra en la posición del gen CTA1 para Y13615 y en el gen CTT1 en la Y04718, haciendo que pierdan la función, además del tipo de apareamiento, Mat a y Mat α respectivamente, para poder ser cruzadas.

La cruce de Y04718 con Y13615, es diploide y su esporulación generó cepas haploides, que por sus características conservaron las auxotrofías y sólo presentaron diferencias en el tipo de apareamiento y en la presencia o ausencia de las dos catalasas.

La cepa silvestre de *D. hansenii* utilizada es la Y7426, que no contiene ninguna auxotrofia, ni modificación genética.

La amplificación de los plásmidos y algunas de las transformaciones se llevaron a cabo en *Escherichia coli* Dh5 α .

Las cepas transformadas, originalmente acatalasémicas, contienen el plásmido pRS316::DhCTT1. Fueron llamadas Sc T-3 , Sc T-7 y Sc T-15, "T" por la palabra transformante y el número por la colonia elegida después de obtenerlas del medio de selección.

Condiciones de cultivo y crecimiento

Los preinóculos de *Debaryomyces hansenii* y *Saccharomyces cerevisiae* se crecieron en YPD que contiene 1% de extracto de levadura, 2% de peptona de caseína y 2% de dextrosa, en el caso de *D. hansenii* se adicionó 0.6M de NaCl, incubándose a 28°C durante 24 h con agitación constante.

Las curvas de crecimiento se realizaron en 100ml de YPD-NaCl (0.6M) para *D. hansenii* y en 100ml de YPD para *S. cerevisiae*; de los preinóculos se calculó la cantidad a tomar para inocular los medios a 0.05 de D.O._{600nm}.

Las cepas se incubaron por 72 horas y se tomaron muestras a las 0, 2, 4, 6, 8 y 10 horas; del segundo día se tomaron muestras a las 24, 26,28,30,32; del tercer día se tomaron a las 48, 52 y a las 56 horas, y por último a las 72 horas de cultivo. La absorbancia se evaluó a 600nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 640.

Obtención de células competentes

Las células de *E. coli* (*DH5 α*) se prepararon con CaCl₂ 100m M/17% glicerol para obtener la competencia, se revisó mediante un control negativo conteniendo ampicilina la ausencia de resistencia a este antibiótico. Esto es debido a que los plásmidos usados tienen resistencia a ampicilina para seleccionar transformantes.

Protocolo: PREPARACIÓN DE CÉLULAS QUIMIO-COMPETENTES (CaCl₂)

1.- Tomar una colonia aislada de Dh5 α e inocular en 2 ml de LB por 8 horas a 37°C que será el pre-inóculo.

2.- Tomar 0.2 ml del pre-inóculo e inocular 2 ml de LB con el antibiótico deseado, incubar a 37°C y revisar que no exista un incremento en la densidad óptica a 600 nm de longitud de onda. (control negativo).

3.- Inocular con 1 ml del pre-inóculo 100 ml de LB e incubar a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 600 nm de longitud de onda.

4.- Reposar el matraz 10 min en agua-hielo.

5.- Centrifugar 10 min a 5Krpm a 4°C, descartar el sobrenadante.

6.- Resuspender en 2 ml de CaCl₂ 100 mM/17% glicerol frío (este paso se puede repetir para tener células más limpias).

7.- Incubar 4 horas a 37°C con agitación.

8.- Preparar alícuotas de 100 μ l , congelar en N₂ líquido y almacenar a -70°C

Transformación de *E. coli* y minipreparación de plásmidos

E. coli DH5 α se utilizó en repetidas ocasiones para mantener y amplificar los plásmidos, en todos los casos el medio de selección fue LB ampicilina. Los plásmidos se extrajeron mediante mini preparación.

Protocolo: TRANSFORMACION DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli* Dh5 α

- 1.- Se descongelan las células competentes en hielo
- 2.- Ya descongeladas se transfieren 30 μ l a otro tubo (control sin DNA)
- 3.- Se añaden 5 μ g de pRS316, y se agita
- 4.- Se sumergen los tubos en nitrógeno líquido durante 2 minutos e inmediatamente se colocan a 47°C durante 2 minutos. Este paso se repite una vez
- 5.- Se les agrega 1 ml de LB y se incuban a 37°C durante 1 hora, con agitación
- 6.- Se espatulan 50 μ l, 100 μ l y 200 μ l, en cajas con LBamp 100 μ g/ml, y se dejan en la incubadora a 37°C por 24 hrs.

Protocolo : MINIPREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS

- 1.- Picar 5 colonias y poner a crecer en 3 ml de LBamp durante la noche
- 2.- Separar los 3 ml en alícuotas de 1 ml en 3 tubos eppendorf y centrifugar durante 20 ó 30s
- 3.- Descartar el SN y agregar 1 ml TE/NaCl 100mM. Resuspender en vórtex
- 4.- Centrifugar 30 segundos, decantar dejando aproximadamente 50 μ l y resuspender en ese líquido residual.
- 5.- Añadir 450 μ l de TENS. Agitar suavemente y reposar en hielo 5 minutos.
- 6.- Agregar 225 μ l de NaOAc 3 M, pH 5.2. Agitar por inversión 25 veces y dejar reposar en hielo 5 minutos

- 7.- Centrifugar 5 minutos a temperatura ambiente
- 8.- Recuperar sobrenadante y agregar 1 volumen de etanol. Vórtex ligero. Centrifugar 5 minutos a 4°C
- 9.- Lavar, despegando la pastilla, con etanol al 70% y centrifugar 2 minutos
- 10.- Decantar SN, dar un centrifugado rápido y aspirar el resto del SN con micropipeta
- 11.- Secar 10 minutos a temperatura ambiente
- 12.- Resuspender en 20 µl de TE o agua y almacenar a -20 o a -70°C

Preparación del plásmido pRS316

Se toman las células de *E. coli* competentes y se transforman con el plásmido pRS316, esto es con el fin de amplificarlo para después poder insertarle el material genético. pRS316 tiene un total de 4,887pb, resistencia a ampicilina y el gen URA3 como marcadores de selección, además del origen de replicación de *E. coli* y de *S. cerevisiae*; también posee sitios de restricción para *Sall* y *BamH*, en el sitio de clonación múltiple (figura 3).

Para seleccionar las células que tienen el plásmido, se plaquea en medio LBamp y, se dejan en incubación durante 24 h a 37°C. Ya que las colonias son visibles, se seleccionan 5 de ellas para comenzar con la minipreparación del plásmido, éstas se inoculan en medio LBamp, y se dejan creciendo durante la noche; lo cual es necesario para obtener suficiente plásmido y proceder con la minipreparación.

Ya terminada la minipreparación del plásmido, éste debe ser limpiado y para eso se debe correr en un gel de agarosa y purificarse, el kit que utilicé para la purificación es el Zymoclean™ Gel DNA Recovery, el cual seguí de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Ya limpio el plásmido, se procede con la restricción cortando con las enzimas *BamHI* y *Sall*. El producto de la digestión se vuelve a purificar con el mismo kit y queda listo para la ligación.

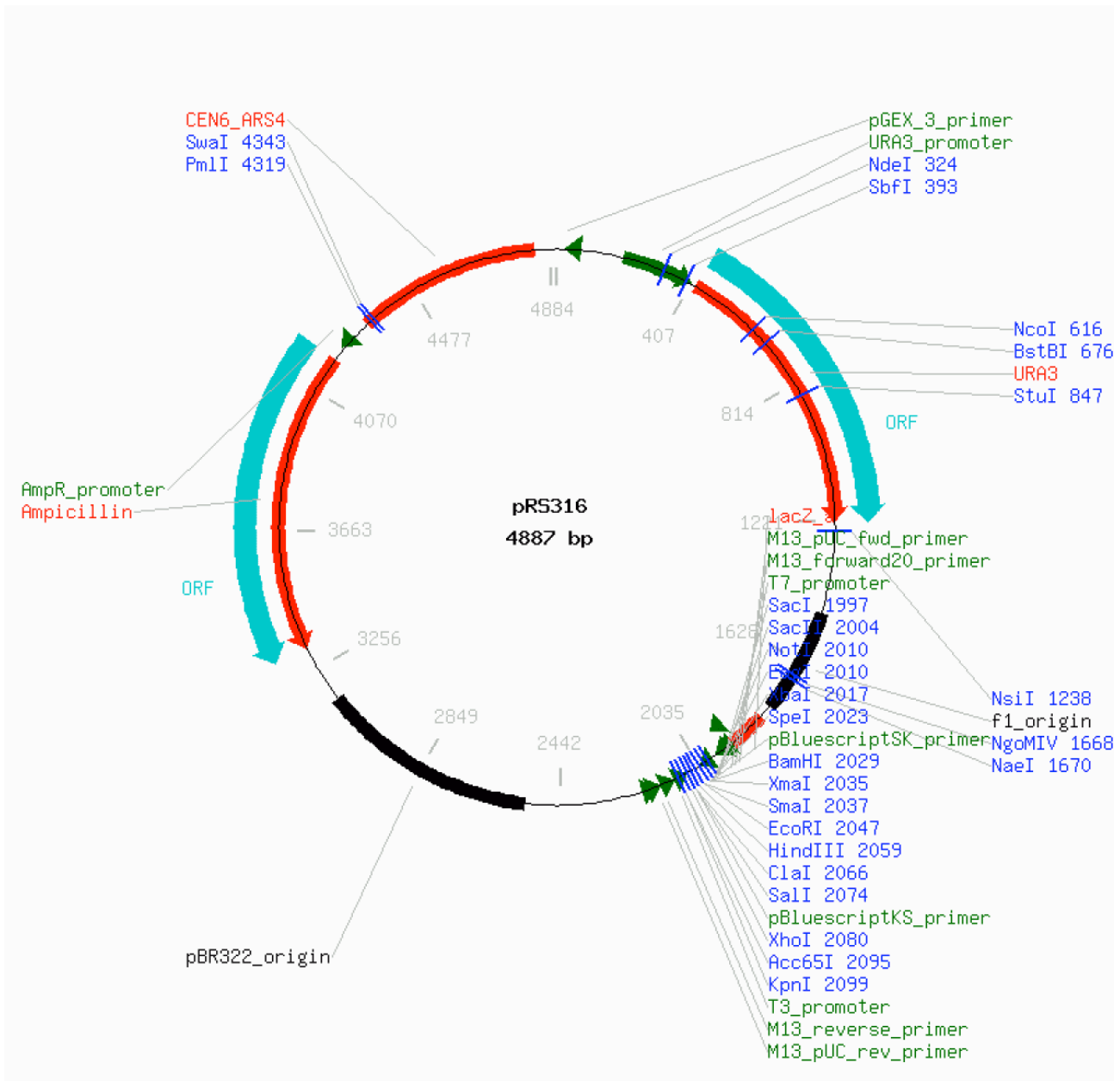


Figura 3: Plásmido pRS316

Extracción del DNA genómico de *D. hansenii*

Se extrajo lisando las células mecánicamente con perlas de 1,180 μm de diámetro, la separación de proteínas, lípidos y DNA se llevó a cabo con PCI en dilución 25:24:1, se recuperó la fase acuosa y la precipitación fue hecha con NaOAC 3 M pH 5.2 y dos volúmenes de etanol al 100% y fueron dejadas en frío. Finalmente se lavó el DNA con etanol al 70%.

Protocolo: EXTRACCIÓN DEI DNA GENÓMICO PARA LEVADURA.

1.- Crecer a *Debaryomyces hansenii* en medio de cultivo YPD + NaCl .6 M a saturación a 30°C por 24 horas.

2.- Centrifugar 10 minutos a 3,000 rpm, decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 5 mL de agua destilada y estéril.

3.- Preparar alícuotas de 500 μl en tubos eppendorf. Centrifugar 5 segundos y decantar el sobrenadante, resuspender la pastilla en el líquido residual.

4.- Agregar 200 μl de la solución 1 más 200 μl de la solución 2 y 300 μg de perlas lavadas, vortex 5 minutos y agregar 300 μl de agua o TE.

5.- Centrifugar 5 minutos, y pasar la fase acuosa a un eppendorf nuevo, agregar 1 ml de etanol al 100% y mezclar por inversión 20 veces, centrifugar 2 minutos, decantar el sobrenadante y resuspender en 400 μl de agua y agregar 3 μl de RNAsa a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Incubar 5 minutos a 37 °C, agregar 8 μl de acetato de amonio 4 M + 1 ml de etanol al 100% y mezclar.

6.- Centrifugar 2 minutos, lavar una vez con etanol al 70% y resuspender en 200 μl de agua.

7.- Lavar dos veces con PCI y una vez con CI (cloroformo:isoamílico 24:1).

8.- Precipitar con un décimo del volumen con NaOAC 3 M pH 5.2 y dos volúmenes de etanol al 100%. Dejar por lo menos 2 horas a -20°C, centrifugar 15 minutos a máxima velocidad.

9.- Lavar una vez con etanol al 70% y dejar secar.

10.- Resuspender en 20 o 50 μl de agua o TE.

Cebadores y PCR para amplificar *DhCTT1*

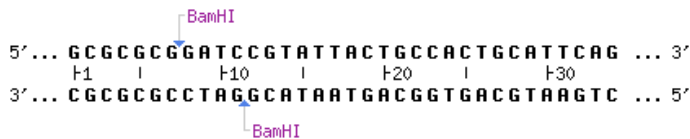
A partir del DNA genómico de *D. hansenii*, se amplificó por PCR el gen *CTT1*, con los cebadores *DhCTT1F* y *DhCTT1R* que llevan incluidos los sitios de restricción *BamHI* y *SalI* (figura 4), que serán utilizados para la clonación del amplicón en el plásmido pRS316. La PCR fue realizada con una polimerasa de alta fidelidad AccuPOL™ DNA Polymerase.

Los cebadores alinean en el gen *DhCTT1*, la secuencia codificante se ubica en el cromosoma B de la hebra complementaria entre las bases 1'281,779 y 1'283,452 siendo de un total de 1,674 (tabla 1). Junto con el gen *DhCTT1*, los cebadores abarcan 1000pb río arriba y 300pb río abajo, con el fin de incluir las regiones 5' río arriba y la 3' río abajo, para conservar reguladores de la transcripción y el promotor completo.

Tabla 1 : Características de los cebadores

Cebador	Tm	%GC	Secuencia 5'-3'
Forward (<i>DhCTT1F</i>)	64.95	45.45	gcgcgggatccgtattactgccactgcattcag
Reverse (<i>DhCTT1R</i>)	64.70	47.62	gcgcggtcgaccgaatggtgaaactcactgtg

CEBADOR FORWARD



CEBADOR REVERSE

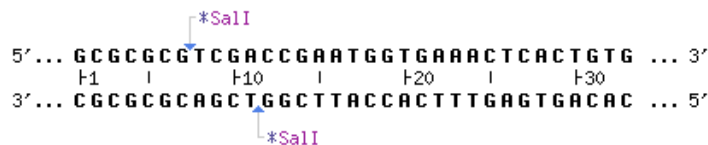


Figura 4. Sitios de corte de las enzimas de restricción adicionados con los cebadores *DhCTT1F* y *DhCTT1R*

Amortiguador de amonio 10X	5 μ l
dNTP's (10mM)	1 μ l
Cebador <i>DhCTT1R</i> (100ng/ml)	2 μ l
Cebador <i>DhCTT1F</i> (100ng/ml)	2 μ l
AccuPOL™ DNA Polimerasa	1 μ l
H ₂ O	38 μ l
DNA de <i>D. hansenii</i>	1 μ l

Programa para amplificar *DhCTT1* (tabla 2)

94°C - 5min desnaturalización inicial
 95°C - 2min desnaturalización
 55°C - 1min apareamiento
 72°C - 1min extensión

} X5

94°C - 1min desnaturalización
 60°C - 1min apareamiento
 72°C - 2min extensión

} X30

72°C - 10min extensión final
 8°C - ∞

attaaaatattccatggggcagtataaaaggtattactgccactgcattcagggcattatagtaaactctgattttttactatattgagttctcaatg
 gcacgfttacattaggaactaagaaatgtgattatcacaattcattggaatacaagacattattaggcattattttggaatataagcacata
 atttatatttataaaaaatctctgtttgaaatggtagcaagtagactttgaaaaatttataaactctaactcttacagaaatactcagat
 aattgtaggtaaatatagcccaattaatctaggatatttctgtctgacttagtagtccaatacattaaatagctatattgcaactcaagatt
 tcatcctatccaaatcaatctaaattcgagttcacaccagttattttgaaatactatctcataattagttgtataattgggtaaatatggtgc
 cacagttgttaagagaagatatgtacgtgttgtaattgtttgcaattattctggtatctcacaacactccactaacgtatattgctgaaattatc
 gttggtatgcatatagtgagcttaaaaaggggttgacattttcaattgattcggactcgttccggcttgaactcgtatgattgaatgatcgtt
 agcgattaattagcaatacaataattgagttgctgtaagcaaaagagatattacgctattatattacacatccactattagtagactgcaaca
 aagctccagtaaggataggtaattggtatctgacgttgaaattcagtttttaagaccacaacactctgaaatattcatttctgtaattcaa
 tttttatctttgtttgatttagtcaaagtatagtaattcgtcgtatctattgagccaatagcaacaatcgaatttcaaatatcatgtattcaactcaga
 aaaatttccaaacctgtaaataggtaaatatgcagcaattatcagcgatctgactaataataggcgatgttctagaaagtgagacatagcttgc
 tataattgagttgctataatgaaggctataaaaacgactgcctagcacacattagaattagcctaaacaaaattctaactgcttattgtaaaa
atggtttctgaatacattcaaaatacgaagaagatccagcagtgactcaacctccaatggagttccttatgccaatcatccatattggtgccca
 aacggcaggccctggcggccactattattgcaagatttaattgatggacgacatttctcactcgtatgaaagaatcccagaaagagttg
 ttcacgcaaaaggtgggtgctcacggatattcgaattgactgattcattgtctgatttaactatgcccgccattacaatcccaggctataaa
 tgcctgtatcagttagattctctacagttggaggtaaaaggggtacaccggacacaataagagatccaaggggttctcaatfaattgaaaa
 ctgacattggaatattgattgggttttaacaataaccaatctcttatttagagaccgattaagttctccaaatttattcacacccaaaagaga
 gatccatctcaaaaccttaataactgatccataacttgggactcttattcagaatcctgaatgcttacatcaataacttacatgttt
 ggtaaaaggggtattccaagagttggccgaaatgcacggatattcgggtcacaatttaactaataacgataaagatgaaattactata
 ttcagatccattgtctgctgattggagggtttgacggcttagtgacaaagaaggtaaagagttggctggtcatcacctgaatacaactaagg
 atttatgaaagaattgctgctgtaattatccatcatattcattttatgttcaaacgatgacacctaacaagctgaagaattcgttattctatcaa
 tgatttaacaaaagatggcctcacaagaattccattaagaaagttggccgcatggtttagataagaatccggtaaattaccacgatgaa
 attgaacaaaattgctttcacctgctcatttagttccggaattgagcctcaaatgatcctgttttacaatctaggttatacttactctgatacacat
 cgtcatagattaggcgccaattaccaacagttaccggtaacaaaccaaggacatttgatagtaattctggatgcttatttagcaggtaatttc
 aaagagaagggattgcatctattgataatcaaggatctagacctaatatttagttcgttattacctattaattctgtctcgaacgatccaagtc
 tacaagaatggattaccctgttgaagaaaaaagtatttaggtgttccgaaacgatctactgataaatatgaaattttagcagaaagaac
 gtaattgaaggcacatgaagaaaaaattggctcaaatcgtatgactatattctggatttagtgagctagattgaaacagccaagagccctt
 ataaaaatatttagtaagcaagataaagggatttcatagaagctattgttgacatgcatcgaataaaggttctcaataaaaagaaag
 agtacctcagttatgggtttgatagcgggatttaggaaggaagttgctaaaggttaggagtaagttacaagcatctactgttgacgaata
 tatcgaagatcttgaatagctcctgctaactaataaattatctacgtatctgacgatgaatatttaatagaaaacatttaagtgaacaaaatg
 ataatttcatacataatggtgaaattaggtaaaaaagatttcataaaaagatttgcatttctatggttagtaagaaagatttagatacgcatt
 agggatattaatagcagttctcgttctaagagagaaatactgaaatatttttattctaattgacaaatttaataaaaaacagttacgttaacctgta
 gcattactttaaatttaaaactctactaataactcaactattgttaa**cacagtgagttcaccattcg**aatgagtagacattcggatcctcctc
 agcctcagaggatgattactgcctcggtagtaga

Figura 5. Secuencia y regiones de alineamiento de los cebadores: gris secuencias flanqueantes al gen *DhCTT1*; azul secuencia codificante; rojo codones de inicio y paro de la transcripción; verde sitio de alineamiento del cebador forward; morado sitio de alineamiento del cebador reverse

Doble digestión con *Bam*HI y *Sal*I

Ya obtenido el amplicón (figura 5) y amplificado el plásmido pRS316, se llevó a cabo la restricción de ambos fragmentos de DNA mediante una doble digestión con *Bam*HI y *Sal*I, utilizando enzimas de Fermentas® y siguiendo las recomendaciones del fabricante (tabla 3).

	pRS316	Amplicón DhCTT1
Producto de PCR	10µl	10µl
10x Buffer <i>Bam</i>HI	2µl	2µl
<i>Bam</i>HI	1µl	1µl
<i>Sal</i>I	2µl	2µl
H₂O	5µl	5µl

La reacción se incubó durante 4 horas a 37°C

Purificación de DNA de gel de agarosa

Después de la doble digestión tanto del inserto como del plásmido, fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa con el fin de limpiarlos.

La purificación fue hecha con el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery y siguiendo las recomendaciones del fabricante; reducir al máximo posible la exposición a rayos UV al momento de la escisión de la banda y evitar incrementos en la temperatura al momento de disolver la agarosa son precauciones muy importantes para no reducir la eficiencia de ligación.

Protocolo: PURIFICACIÓN DE DNA DE GEL DE AGAROSA

1.- Añadir 3 volúmenes de *buffer* ADB por cada volumen de gel en el que se encuentra la banda de interés.

2.- Incubar a 50°C durante 10 minutos, hasta disolver la agarosa. Transferir a un tubo con filtro de sílica y centrifugar a 14 Krpm durante 30 s

3.- Añadir 200 µl de *buffer* de lavado al tubo con el filtro de sílica y centrifugar por 30 s a 14 Krpm (repetir este paso dos veces).

4.- Eluir el DNA del filtro de sílica con agua estéril, desionizada y libre de nucleasas, en un volumen de 6 a 10 μ l (recomiendo usar el mínimo)

Ligación de *DhCTT1* y pRS316

Se ligó con el kit de Fermentas® Rapid DNA ligation, se dejó a temperatura ambiente durante 24 h (tabla 4). La proporción molar de vector:inserto que se usó fue de 1:3 respectivamente, de acuerdo a las especificaciones del protocolo. El inserto tenía 3,174 Kb a una concentración de 100ng/ μ l. El vector tenía 4,887 Kb a una concentración de 20 ng/ μ l,

Los cálculos se hicieron utilizando Fermentas REviewer sequence analysis tools.

Tabla 4. Mezcla para la ligación de pRS316 y el amplicón *DhCTT1*

Inserto DNA (3:1 exceso molar sobre vector)	98.5 ng
5X Rapid Ligation Buffer	5 μ l
T4 DNA Ligasa	1 μ l
H ₂ Odd y sin nucleasas	2.3 μ l
Vector de DNA linearizado	80 ng

La reacción se dejó incubar durante 24 h a 22°C.

Después se transformó en *E. coli* para su amplificación y posterior extracción, para comprobar que fue armado correctamente mediante la liberación del inserto y el corte de éste (Figura #)

El resultado de la ligación es el plásmido pRS316::*DhCTT1*

Transformación de la cepa acatalasémica

Con el plásmido ya construido, se preparó la cepa acatalasémica para la transformación. Se utilizó DNA de esperma salmón como acarreador (tabla 5).

Después de la transformación hice la selección, que se realizó mediante el plaqueo en cajas con medio mínimo sin aminoácidos y se añadieron los aminoácidos para complementar las

auxotrofías de la cepa de *S. cerevisiae*, excepto para Ura, la cual es complementada por el plásmido pRS316::*DhCTT1*. Posteriormente se seleccionaron las colonias que crecieron mejor.

Solución TEL		Solución TELP	
Buffer TE 10X, pH 7.5	1 ml	Buffer TE 10X, pH 7.5	1 ml
Acetato de litio	1 ml	Acetato de litio	1 ml
H ₂ O ₂	cbp 10 ml	PEG 4,000 al 50%	8 ml

Protocolo: Transformación de *S. cerevisiae*

1.- Inocular 10 ml de YPD con la cepa deseada, en este caso la cepa acatalasémica. Dejar en agitación a 220 rpm a 28°C durante la noche.

2.- Centrifugar a 3,000 Krpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y desechar el sobrenadante. Resuspender la pastilla en 2 ml de H₂Odd estéril y medir la densidad óptica.

3.- Inocular 50 ml de YPD a una D.O_{600 nm} de 0.1; incubar a 260rpm a 28°C hasta una D.O._{600nm} de 0.4

4.-Centrifugar a 3 Krpm, descartar el sobrenadante y resuspender en 1 ml de H₂Odd estéril; transferir el líquido a un tubo de 1.5 ml y centrifugar a 14 Krpm 10 minutos.

5.- Resuspender la pastilla con 1 ml de la solución TEL, centrifugar 10 s a 14 Krpm, descartar el sobrenadante y resuspender en 200 µl de la solución TEL (¡A partir de este concentrado se utilizan 50 µl por evento de transformación!)

6.- Adicionar 1µg del DNA que se deseada introducir, 10 µl de DNA de esperma de salmón 5 mg/ml, previamente hervido y colocado 5 minutos en hielo; añadir 300 µl de la solución TELP.

7.- Mezclar en vortex e incubar en agitación a 250 rpm a 30°C, durante 30 minutos e inmediatamente añadir 40 µl de DMSO y agitar en vortex e incubar en agitación a 42°C durante 15 minutos.

8.-Plaquear en cajas de medio mínimo con las auxotrofías suplementadas excepto uracilo.

Obtención del extracto proteico

A partir de la cepa acatalasémica transformada, la acatalasémica, $\Delta ct1$, $\Delta ta1$, la cepa silvestre y *D. hansenii*, se obtuvieron extractos crudos. Las células se pusieron a crecer en el medio correspondiente durante 72 horas y se colectaron al finalizar este periodo. Las células fueron mantenidas en agua-hielo para mantenerlas frías. Se lisaron en forma mecánica en presencia de un *buffer* de extracción de catalasas, con la ayuda de perlas de 710-1180 μm de diámetro y el vortex. Posteriormente se centrifugó 20 min para remover los restos celulares y se almacenaron a 4°C.

Tabla 6: Buffer de extracción de catalasa

Reactivo	Concentración
Glicerol	20%
TrisHCl	0.1M, pH 8

Protocolo: Obtención de extracto proteico

1.- Poner un tubo de ensayo, una pipeta Pasteur y tubos de polipropileno de 1.5 ml en hielo por cada experimento. También tener una centrifuga a 4°C.

2.- Colectar las células después de 72 h y centrifugar 10 min a 3,000 rpm, descartar el sobrenadante y resuspender en 25 ml de H₂O estéril; volver a centrifugar a 3,000 rpm para lavar las células

3.- Resuspender en 1 ml de *buffer* de extracción de catalasa (tabla 6). Pasar a los tubos de ensayo fríos y añadir ½ del volumen en perlas para la lisis.

4.- Agitar en el vortex 1min e inmediatamente colocar en hielo durante 1 minuto; repetir este paso 6 veces por lo menos.

5.- Transferir a los tubos de polipropileno fríos de 1.5ml con las pipetas Pasteur también frías. Centrifugar 20 minutos en frio (4°C) y recuperar el sobrenadante.

6.-El sobrenadante puede ser almacenado durante 24 horas a 4°C

Ensayo de Bradford: Concentración total de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se realizó por el método de Bradford

Se realizó la determinación para cada cepa por triplicado. Se realizaron los cálculos a partir de la absorbancia registrada mediante el uso de la ecuación de una recta encontrada de una regresión lineal hecha a partir de puntos obtenidos de soluciones de BSA con concentración conocida y dentro del rango de linearidad.

Protocolo: Ensayo de Bradford

1.- Preparar reactivo de Bradford en proporción 1:5. Una parte de reactivo de Bradford por cuatro partes de H₂O estéril.

2.- Añadir 20µl de BSA a 1 ml de reactivo de Bradford preparado. Realizarlo con por lo menos 4 concentraciones conocidas que estén entre 0.1 mg/ml hasta 0.9mg/ml

3.- Incubar la reacción durante 5 minutos y leer la absorbancia a 590nm.

4.- De las muestras problema, se hacen diluciones hasta que al agregar 20 µl a 1 ml de reactivo de Bradford preparado y al ser leído a 590 nm quede dentro de entre los puntos de la recta patrón de BSA.

5.-Hechas las diluciones tomar 20 µl y añadirlos a 1 ml de reactivo de Bradford; dejar incubar 5 minutos a temperatura ambiente; leer la absorbancia a 590 nm (realizar mínimo por triplicado)

6.- Limpiar las celdas cada vez que se usen con etanol al 70%, un segundo lavado con H₂O destilada y por último secar utilizado cotonetes.

Actividad específica de catalasa

El ensayo se realiza con el extracto crudo en un *buffer* de fosfatos a pH 7.0. El ensayo se prepara en una celda de cuarzo en la que se añade *buffer*, el cual es utilizado como blanco. Después se añade el extracto y el peróxido de hidrógeno como sustrato para la reacción y

rápidamente se lee en el espectrofotómetro a 240nm durante 3 minutos. La pendiente resultante de las múltiples muestras tomadas representa la cantidad de peróxido de hidrógeno degradado y la actividad específica se calcula utilizando la siguiente fórmula:

Actividad específica = $\text{mmin}/\epsilon/\text{mg de proteína/ml}$, en donde
mmin = pendiente por minuto del decaimiento en la $A_{240\text{nm}}$
 ϵ = Coeficiente de extinción molar de la catalasa = 0.0422 M/cm (Nelson y Kiesow, 1972)

Protocolo: Ensayo de actividad de catalasa

Para el ensayo de catalasa se utilizan únicamente celdas de cuarzo

1.- Utilizar como blanco el coctel de actividad de catalasa

2., Preparar una solución de H_2O_2 500 mM

3.- Añadir 2.9 ml de *buffer* de actividad de catalasa, 10 μl de extracto proteico y 100 μl de H_2O_2 500 mM e inmediatamente leer en el espectrofotómetro la dinámica a 240 nm. Es importante agregarlos en este orden ya que la reacción es muy rápida

4.-Como mínimo recomendable, realizar por triplicado por cada extracto proteico.

Electroforesis de proteínas (PAGE, Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Laemmli 1970)

La electroforesis se llevó a cabo en geles nativos ya que preservan la estructura cuaternaria y terciaria de las proteínas, a diferencia de los geles desnaturizantes. Conservar la estructura cuaternaria preserva también la actividad de la catalasa tanto de la catalasa T como la de la catalasa A, lo cual es crucial para realizar la tinción del gel y poder observar la actividad de las enzimas (tabla 7).

Tabla 7: soluciones para PAGE nativo	
	30% acrilamida
Solución A	0.8% N'N'-bis-metilen-acrilamida Disolver, filtrar y guardar en frasco ámbar a 4°C
Solución B	Tris-HCl 1.5M, pH 8.8 Ajustar el pH con HCl 1.0 M, guardar a 4°C
Solución C	Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8 Ajustar el pH con HCl 1.0 M, guardar a 4 °C
Solución D	Tris HCl 300 mM, pH 6.8, Glicerol 100 mM Azul de bromofenol
Solución E	Glicina 0.92 M Tris-base 120 mM, pH 8.3

El gel separador se preparó y se vació entre los dos vidrios colocados en el sistema portador de la cámara Miniprotean 3 de BioRad, dejando aproximadamente 3 cm de la parte superior libre. Con una pipeta Pasteur se añadió isopropanol a la parte de arriba del gel con el propósito de nivelarlo y que solidifique de forma pareja. Se dejó polimerizar al menos 40 minutos. A continuación se preparó el gel concentrador y justo antes de iniciar la polimerización (antes de añadir PSA y TEMED), se vació el isopropanol de la cámara. Se llenaron los vidrios hasta el tope con el gel concentrador y se colocó un peine limpio. Se dejó polimerizar al menos 30 minutos. Una vez solidificados ambos geles entre los vidrios se montó la cámara Miniprotean 3 de BioRad y se cargaron las muestras (15 µl por cada pozo: 3 µl de extracto proteico + 12 µl de *buffer* de carga). Se añadió *buffer* de corrida 1X a la cámara la cual fue sellada con agarosa. Los geles fueron corridos a 12V, a 4 °C durante 24 horas aproximadamente.

Preparación de PAGE		
	Separador 7.5%	Concentrador 4%
H₂O	3.6 ml	3.0 ml
Solución A	1.9 ml	0.67 ml
Solución B	1.9 ml	-
Solución C	-	1.2 ml
PSA 10%	50 µl	50 µl
TEMED	12.5 µl	12.5 µl

Tinción del gel para observar la actividad de catalasa (Woodbury y cols. 1971)

Al terminar la corrida, el gel fue separado de los vidrios y se lavó 3 veces con agua de la llave por 1 minuto cada vez, para posteriormente incubarlo en una solución de H₂O₂ 100 mM por 15 minutos con agitación lenta. Se preparó una solución 1:1 de ferricianuro de potasio:cloruro férrico, cada uno al 1% (se pesó 1 gramo de cada reactivo y se disolvieron por separado en 50 ml de agua cada uno y se mezclaron justo antes de usar). Una vez que terminó la incubación del gel con la solución de peróxido de hidrógeno, se eliminó éste último mediante 3 lavados con agua de la llave. Posteriormente se le agregó la solución antes mencionada con el propósito de teñir el gel. Se agitó suavemente hasta que el gel se tiñera de azul oscuro y se revelaran las bandas con actividad de catalasa como zonas incoloras.

Alineamiento de las regiones 5' río arriba

Las secuencias para *D. hansenii* se descargaron de la base de datos de Génolevures (Sherman *et al.* 2009), de la cual se tomaron 1,000 pb río arriba y 400 pb río abajo, desde codón inicial y del codón de paro respectivamente. De igual manera se obtuvieron las secuencias de *S. cerevisiae* de la base de datos “Saccharomyces Genome Database” (Cherry *et al.* 2012).

Los alineamientos fueron realizados con el programa Matcher, provisto por el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) y creado con el software libre EMBOSS.

Detección de las secuencias nucleotídicas de unión de factores de transcripción

Las secuencias fueron analizadas en la base de datos “The Promoter Database of *Saccharomyces cerevisiae*”, usando la herramienta disponible en la base de datos, que busca secuencias putativas, utilizando la secuencia consenso.

RESULTADOS

Caracterización de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Se realizó previamente la cruce, esporulación y disección de tétradas de las cepas Y04718 y Y13615 de *S. cerevisiae*, las cuales presentaban cada una un sólo gen de catalasa, ya sea *CTT1* o *CTA1* respectivamente. Cada tétrada tendría que tener las cuatro posibles combinaciones de genes de catalasa, que son: catalasa T ($\Delta cta1$), catalasa A ($\Delta ctt1$), la que presenta ambas (silvestre) y la que no presenta ninguna (acatalasémica). Se analizaron varias tétradas con el fin de identificar la que presentara las cuatro combinaciones mediante la determinación de la actividad de catalasa en gel de poliacrilamida, y fueron separadas mediante electroforesis. La tétrada 12 fue la que presentó los cuatro genotipos. En el gel teñido donde se cargaron los extractos procedentes de poblaciones de la tétrada 12, se puede observar que están presentes las cepas acatalasémica, $\Delta cta1$, $\Delta ctt1$ y la silvestre (figura 6).

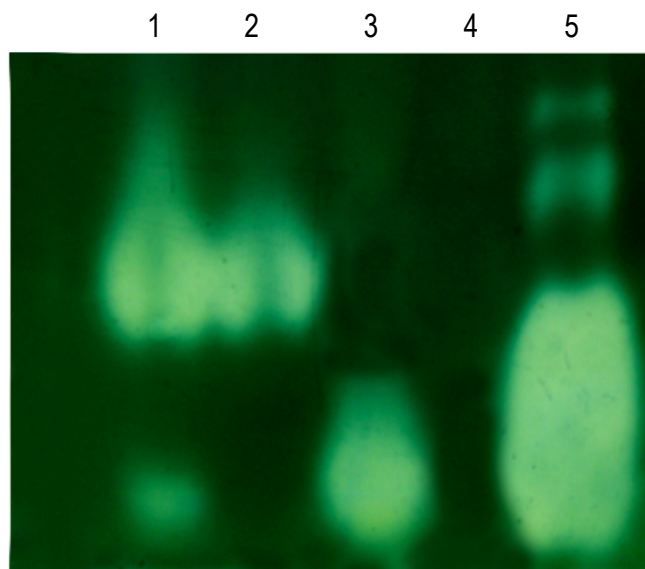


Figura 6: Tinción para catalasa después de haber separado las enzimas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida; carril 1, silvestre; carril 2, $\Delta ctt1$; carril 3, $\Delta cta1$; carril 4, acatalasémica; carril 5, catalasa de eritrocito humano.

Extracción del DNA genómico de *D. hansenii*

Se realizó la extracción del DNA genómico de *D. hansenii* mediante el protocolo descrito en material y métodos, con el fin de amplificar el gen de la catalasa T (*DhCTT1*) mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se obtuvo DNA suficiente para realizar la PCR y amplificar el segmento que contiene la secuencia de *DhCTT1*. El DNA extraído se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Se puede observar que el material no está degradado y no presenta impurezas (figura 7).

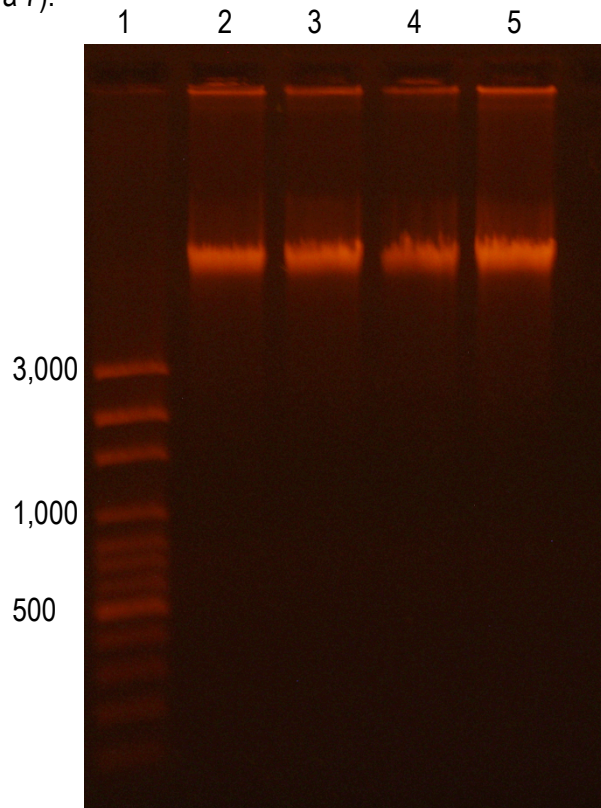


Figura 7: Gel de agarosa al 1% teñido con GelRed. Carril 1, marcador de tamaño molecular; carriles 2, 3, 4 y 5, DNA genómico de *D. hansenii*

Construcción del plásmido pRS316::*DhCTT1*

Se seleccionó al plásmido pRS316 como vector para insertar el gen *DhCTT1* en *S. cerevisiae*. Se transformó y amplificó en *E. coli* DH5 α con los protocolos descritos en material y métodos.

Se analizaron 9 minipreparaciones provenientes de las colonias de *E. coli* Dh5 α que contienen el plásmido pRS316. Las minipreparaciones se confirmaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El DNA plasmídico no se digirió y en el gel se pueden observar las isoformas del plásmido, las cuales pueden corresponder a la forma enrollada, superenrollada y la relajada como se muestra en la figura 8.

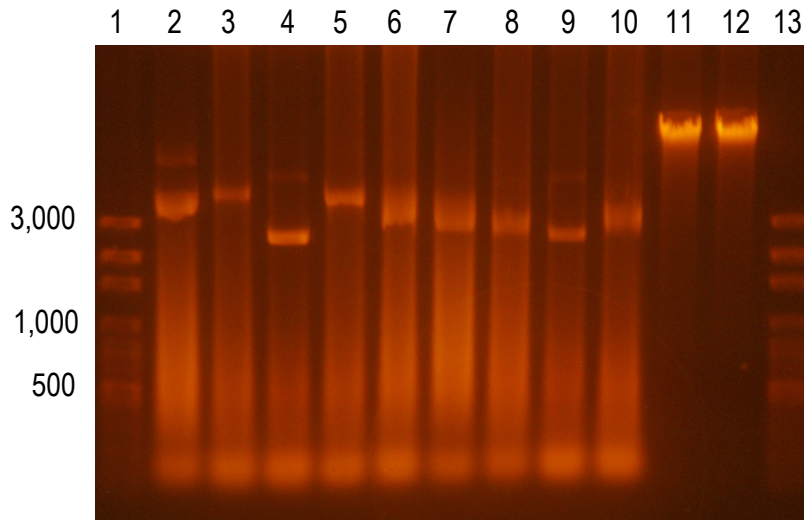


Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1, marcador de masa molecular; carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, plásmido pRS316 sin linearizar procedente de diferentes colonias de *E. coli* DH5 α transformadas; carriles 11 y 12, DNA genómico de *D. hansenii*; carril 13, marcador de masa molecular.

Para corroborar la masa de los plásmidos, se digirió con *EcoRI*. De las 9 colonias se seleccionaron tres para ser utilizadas en la ligación del plásmido con el amplicón que contiene *DhCTT1*. En la electroforesis en gel de agarosa al 1% se muestra que tres de las minipreparaciones dieron el peso correcto de 4,887pb (figura 9).

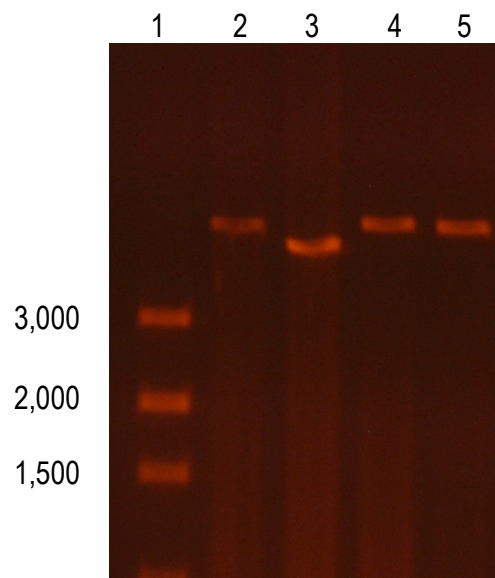


Figura 9 : Electroforesis en gel de agarosa al 1%: carril 1, marcador de tamaño molecular; carriles 2, 4 y 5, pRS316 cortado con *EcoRI* en el peso adecuado. Carril 3, pRS316 cortado con *EcoRI* que no corresponde con la masa esperada.

Con el DNA genómico de *D. hansenii* se realizó la PCR con una enzima de alta fidelidad, utilizando los cebadores *DhCTT1F* y *DhCTT1R*. El amplicón resultante contiene la secuencia nucleotídica de *DhCTT1*, 100 pb río arriba y 100 pb río abajo, con el fin de conservar al promotor y a las regiones 5' y 3'UTR. Se identificó por la masa al amplicón en el peso esperado de 3,269 pb (figura 10). Se digirió con *HindIII*, ya que la secuencia de corte que reconoce esta endonucleasa se encuentra dentro del amplicón. El producto de este corte es un fragmento de 2,466 pb y uno de 803 pb (figura 10), tal como se esperaba (figura 11).

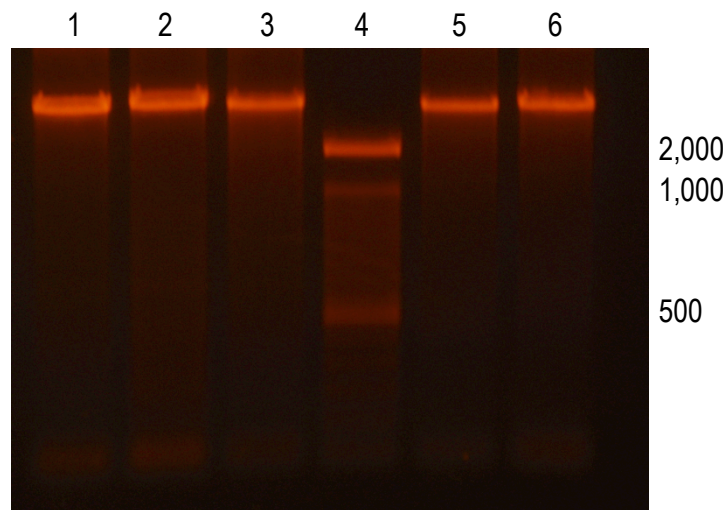


Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa al 1%: carril 4, Invitrogen 100bp DNA ladder; carriles 1, 2, 3, 5 y 6 amplicón utilizando los *primers DhCTT1F* y *DhCTT1R*

Después se procedió a realizar una doble digestión tanto del plásmido pRS316 como del amplicón conteniendo *DhCTT1*, para generar extremos pegajosos y lograr ahí clonar el amplicón en el vector. Luego de la doble digestión, es muy importante hacer la purificación y la ligación rápidamente, ya que los extremos pegajosos se degradan fácilmente. Inmediatamente se procedió a correr el producto de la doble digestión de pRS316 y del amplicón de *DhCTT1* en electroforesis y se purificó la banda de DNA, obteniendo como resultado que el DNA quedara libre de enzimas y de fragmentos de tamaños no deseados; en otras palabras listo para la ligación.

El siguiente paso fue la ligación de pRS316 y del amplicón, resultando en el plásmido final pRS316::*DhCTT1* con un total de 8,156pb. Se tuvieron precauciones porque ligar fragmentos de tamaños mayores a 2Kb reduce la eficiencia de la ligación, además de que en la purificación del

DNA de banda, al tener que ser calentada la agarosa para extraer el DNA, provoca daño a los extremos pegajosos. Fue indispensable mantener los productos de PCR y el pRS316 después de la doble digestión a la menor temperatura posible y al momento de observar la banda utilizar luz UV de onda larga, teniendo también la precaución de exponerla al mínimo de esta radiación en el momento de cortarla.

El amplicón conteniendo el gen *DhCTT1* se logró clonar exitosamente en el vector pRS316, se seleccionó a partir del análisis de restricción de varias colonias de *E. coli* Dh5 α que fueron transformadas químicamente. Se verificó que se tratase del plásmido pRS316::*DhCTT1* observando la forma circular y linear de este en gel de electroforesis; la masa del plásmido es la indicada después de ser linearizado con *Bam*HI. Se hizo también una doble digestión con *Bam*HI y *Sal*I, que liberó el inserto y por último se cortó el amplicón con inserto con *Hind*III que está presente en la secuencia de nucleótidos del amplicón (Figura 11), además de que las células de *E. coli* transformadas con pRS316::*DhCTT1* sí presentaron resistencia a ampicilina.

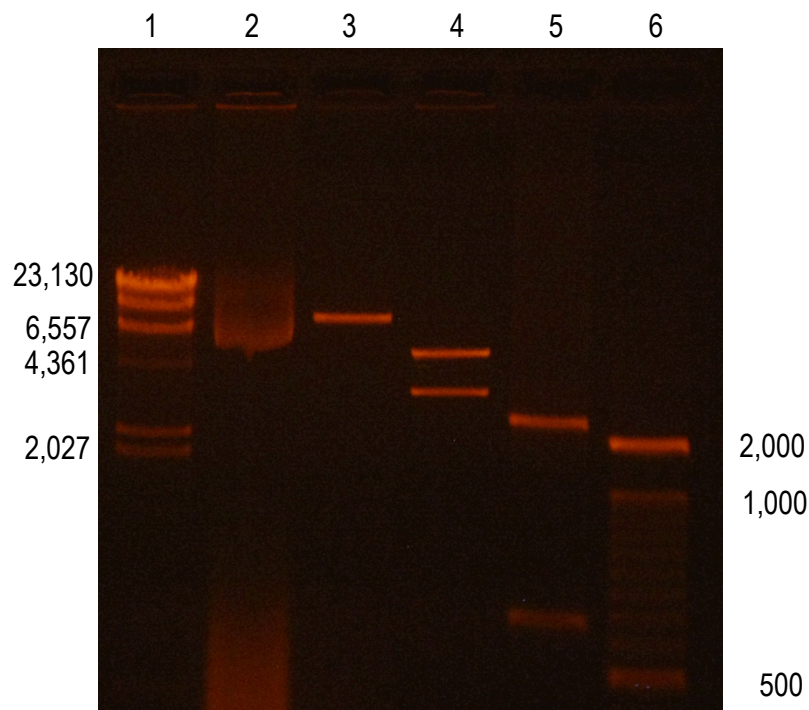


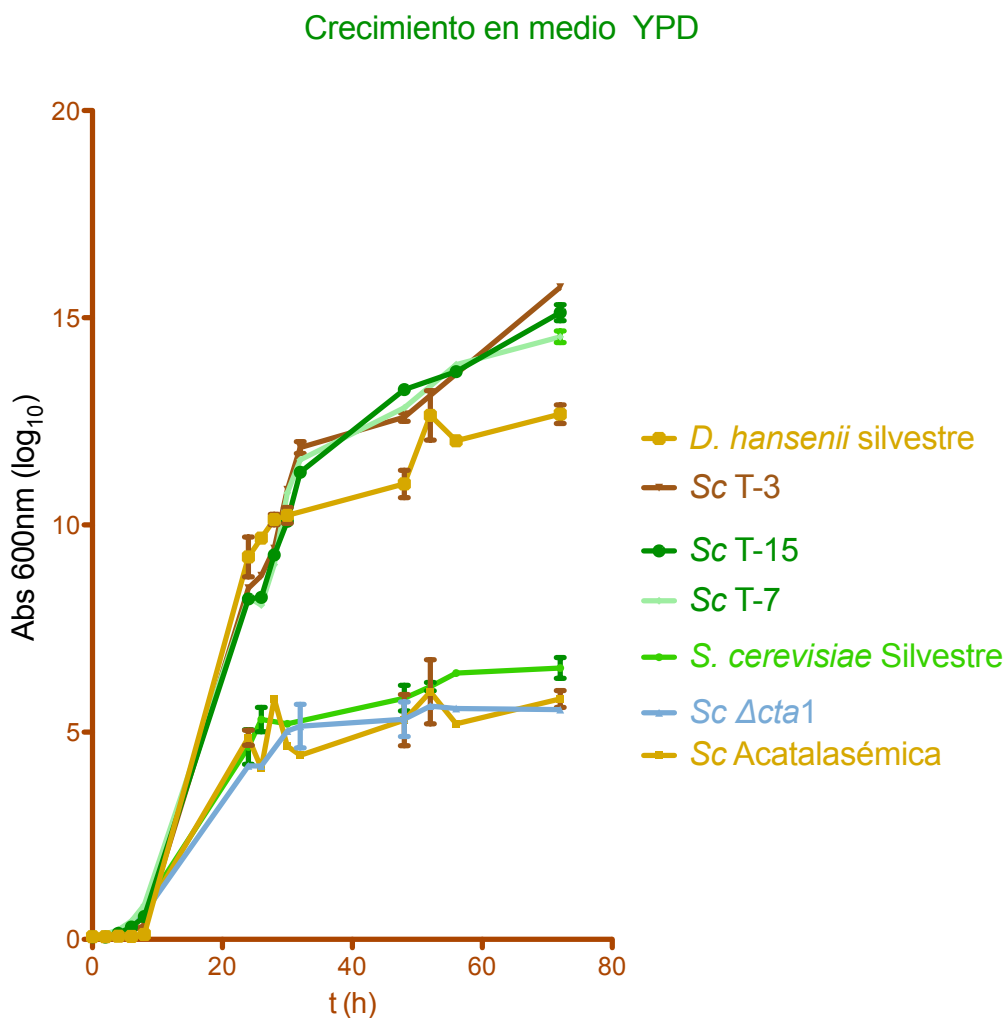
Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1, marcador de la masa molecular; carril 2, pRS316::*DhCTT1* sin digerir; carril 3, pRS316::*DhCTT1* cortado con *Eco*RI; carril 4, inserto liberado del plásmido pRS316::*DhCTT1*; carril 5, amplicón cortado con *Hind*III; carril 6, marcador de la masa molecular.

Transformación de la cepa acatalasémica

Se transformó una cepa acatalasémica con el plásmido pRS316::*DhCTT1*. Se llevó a cabo un experimento de crecimiento de la cepa transformada, creciéndola por 72 h en medio YPD y YPD-NaCl, y se determinó la concentración de proteína total y la actividad específica de la catalasa en extractos obtenidos a partir de estos cultivos. Las células transformadas se plaquearon en medio mínimo con el suplemento de aminoácidos requerido.. La auxotrofia de uracilo, es restaurada por el plásmido pRS316::*DhCTT1*. Cada transformante que creció en el medio de selección se nombró con la letra “T” seguida de un número, el cual hace referencia al número de la colonia.

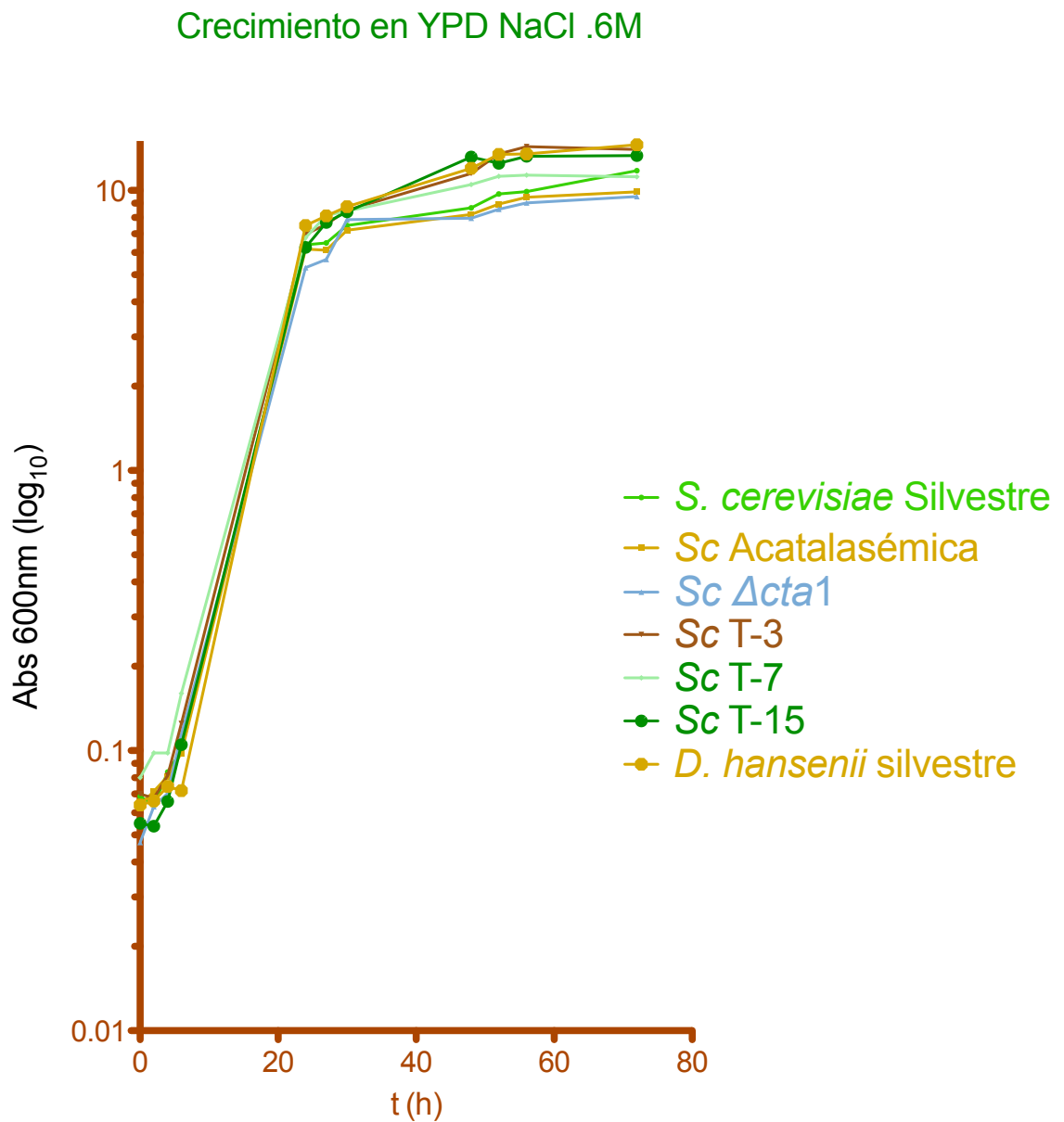
En el medio YPD el pRS316::*DhCTT1* incrementa la biomasa de la cepa acatalasémica transformada.

Con el fin de analizar el comportamiento fisiológico de las cepas transformadas, se llevaron a cabo curvas de crecimiento. Los cultivos se inocularon a 0.05 de D.O a 600 nm y se hicieron crecer durante 72 h. Se cultivaron las transformantes Sc T-3, Sc T-7 y Sc T-15 y la cepa silvestre, $\Delta ct a1$, $\Delta ct t1$ y la acatalasémica transformada con el plásmido pRS316 sin el inserto de *DhCTT1*. En YPD, las cepas transformadas presentaron una velocidad de duplicación similar a la de la cepa silvestre, acatalasémica, $\Delta ct a1$ y $\Delta ct t1$, pero alcanzaron una biomasa mayor (gráfica 1).



Gráfica 1. Curva de crecimiento en YPD con el eje de las ordenadas en Log₁₀: Sc T-7, Sc T-3, Sc T-15 alcanzaron mayor biomasa que las cepas silvestre, $\Delta ct a1$, $\Delta ct t1$ y acat. La pendiente de la fase exponencial es similar para todas las cepas.

El comportamiento en YPD-NaCl 0.6 M fue igual en todas las cepas. La velocidad de duplicación no cambió respecto a las cepas transformantes ni tampoco la masa biológica fue mayor en ningún caso (gráfica 2).



Gráfica 2. Curva de crecimiento en YPD NaCl (0.6M): La velocidad de duplicación fue similar para todas las cepas. La biomasa tampoco difiere mucho entre las cepas; todas las curvas de crecimiento comienzan la entrada a la fase estacionaria cerca de las 27 horas.

Ensayo de Bradford

Con el fin de determinar la actividad específica de la catalasa, se llevó a cabo el cultivo de las cepas transformantes T-3, T-7, T-15 $\Delta cta1$, $\Delta ctf1$, silvestre, acatalasémica y *D. hansenii* en YPD y YPD-NaCl 0.6M por 72 horas. Se colectaron las células mediante centrifugación, se lavaron y se hicieron los extractos crudos. Se determinó la cantidad de proteína mediante el método de Bradford para poder evaluar la actividad específica de la catalasa.

Los resultados de la prueba de Bradford para los extractos proteínicos con la ecuación de las rectas obtenidas con BSA se muestran en la tabla 8. La concentración de proteínas no difiere mucho de cepa a cepa en el mismo medio. La sal provoca una drástica reducción en la concentración total de proteína en los extractos. .

Tabla 8: Concentración total de proteínas (mg/ml)

Cepa	YPD	YPD-NaCl
<i>S. cerevisiae</i> silvestre	188.2	44.3
<i>Sc</i> acatalasémica	214.5	63.0
<i>Sc</i> $\Delta cta1$	298.2	37.6
<i>Sc</i> T-3	329.4	33.3
<i>Sc</i> T-7	331.3	47.0
<i>Sc</i> T-15	370.3	33.1
<i>D. hansenii</i> silvestre	288.3	33.6

Actividad específica de las cepas

Con el fin de verificar que las cepas transformantes expresan el gen heterólogo introducido, se determinó la actividad específica de la catalasa. La actividad específica en medio YPD fue mayor en las transformantes que en las cepas silvestre, $\Delta cta1$, y $\Delta ctt1$, pero fue inferior a la de *D. hansenii*. En medio YPD-NaCl la actividad se incrementó mucho, tanto en las transformantes como en las cepas silvestre, $\Delta cta1$, $\Delta ctt1$. La actividad específica de *D. hansenii* se incrementó, pero no tanto como en las transformantes. La cepa acatalasémica no presentó actividad en ninguno de los medios (tablas 9 y 10). Mediante zimogramas, se observa que la actividad de la catalasa se restauró en la cepa acatalasémica transformada con pRS::*DhCTT1* (no mostrado).

Tabla 9: actividad específica en medio YPD			
Cepas	nmol H₂O₂ oxidado/min/mg proteína		Error estándar
<i>S. cerevisiae</i> silvestre	0.00727545	0.007488592	1.07E-04
<i>Sc</i> acatalasémica			
<i>Sc</i> $\Delta cta1$	0.001553296	0.001343009	1.05E-04
<i>Sc</i> T-3	0.1043001	0.1292402	1.25E-02
<i>Sc</i> T-7	0.08426721	0.08163545	1.32E-03
<i>Sc</i> T-15	0.08818986	0.1123392	1.21E-02
<i>D. hansenii</i> silvestre	0.5679699	0.5273912	2.03E-02

Tabla 10: actividad específica en medio YPD NaCl .6 M				
Cepas	nmol H₂O₂ oxidado/min/mg proteína			Error estándar
<i>S. cerevisiae</i> silvestre	0.6558229	0.3851382	0.5876998	8.13E-02
<i>Sc</i> acatalasémica				
<i>Sc</i> $\Delta cta1$	0.6927153	0.424561	0.4401966	8.69E-02
<i>Sc</i> T-3	1.205406	1.035476	1.004988	6.23E-02
<i>Sc</i> T-7	0.1258892	0.1696916	0.1218468	1.53E-02
<i>Sc</i> T-15	0.9385165	0.979197	0.6926625	8.95E-02
<i>D. hansenii</i> silvestre	1.063503	0.8089473	0.7766094	9.07E-02

Estudio de las regiones 5' río arriba y 3' río abajo.

Una aproximación para explicar las diferencias en la actividad de la catalasa. Se analizaron 1,000pb río arriba a partir del codón de inicio de los genes *DhCTT1* y *ScCTT1* de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* respectivamente. El análisis consistió de la búsqueda de secuencias que son reconocidas por elementos reguladores en *S. cerevisiae*. Se obtuvieron las secuencias consenso del proyecto "The Promoter Database of *Saccharomyces cerevisiae*" y usando una herramienta disponible en ese proyecto se analizaron las secuencias obtenidas.

Región 5' río arriba de *D. hansenii* del gen *DhCTT1*

La secuencia 5' río arriba del gen *DhCTT1* (figura 12) tiene dominios de unión para la TBP (proteína de unión a TATA), la cual es un factor de transcripción general y controla un gran número de genes, ya que mutantes de *ScSPT15* crecen lentamente y tienen problemas para la esporulación y el apareamiento en *S. cerevisiae* (Eisenmann *et al.* 1989). Además en esta región se encuentra en repetidas ocasiones la secuencia que es reconocida por el factor Gcn4p, el cual forma parte del sistema general de control de biosíntesis de aminoácidos en *S. cerevisiae*. Induce la transcripción de genes que se encuentran reprimidos en la ausencia de uno o varios de los aminoácidos y varios de los genes involucrados en la síntesis de aminoácidos están bajo este control, por ejemplo la DAHP sintetasa, involucrada en la síntesis del triptofano o genes como *HIS4* (Hinnebusch 1988). Además, se encuentra la secuencia reconocida por la proteína Bas2p, que en conjunto con Bas1p es capaz de inducir la transcripción del gen *HIS4* en condiciones limitantes de adenina o de fosfato. Sin embargo la transcripción de *HIS4* no ocurre de manera independiente (Ticebaldwin *et al.* 1989). Cabe mencionar que además de Bas1p y Bas2p, la transcripción de *HIS4* es dependiente de Rap1p (Devlin *et al.* 1991).

Asimismo, el análisis dio como resultado un sitio de unión para Pho4p, un factor que activa transcripcionalmente genes relacionados con el metabolismo del fosfato, entre ellos: PH05, PH08 , PH081 y PH084 (Berben *et al.* 1990).

Se localizó la secuencia que es reconocida por Gcr1p, el producto es un activador de genes relacionados a la vía glucolítica. La cancelación de *GCR1* en *S. cerevisiae* tiene como consecuencia una reducción en los niveles de transcripción de *ENO1*, *ENO2*, *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* de 20 veces respecto a la cepa silvestre (Holland *et al.* 1987).

AP-1, fue puede ser el sitio de unión del factor de transcripción Yap1p. El factor Yap1p es uno de los factores de respuesta a estrés oxidante. En un experimento con una mutante sin el gen *YAP1*, la actividad de la catalasa no se incrementó con un estímulo de H₂O₂, como en la cepa silvestre (Lee *et al.* 1999). También se ubicó la secuencia de unión del factor ROX1, que reprime la expresión de genes de hipoxia (Balasubramanian *et al.* 1993)

Se detectaron las secuencias de reconocimiento de Mcm1p, que es un factor de transcripción involucrado en la represión y activación relacionados con el tipo de apareamiento por la formación de complejos enzimáticos y la interacción con las secuencias en el DNA (Elble *et al.* 1991).

Además, se localizó un sitio de unión de factores de transcripción de respuesta a estrés por calor (HSTF), la proteína que se une a esta secuencia es HSF o también llamada HSTF (Sorger *et al.* 1987).

```

ataatttaattttattaaaaaaatctctgtttgaaatggtgacaagttagactttagaaaaattttataaactctaact
tcttacagaataacttcagatataattgtaggtaaatatagcccaattaatctaggatattattcctgtctgacttagtag
agtccaatacattaaaatagctatatttgcactcaagatTTTTTtatccattatccaaatcaatctaaatttcgagttcaca
ccagttattattgaaatacttattctcataatTTtagttgtataaattgggtaaatatgggtgccacagttgTTTTaagaga
agatatgtacgtgTTgtaattgTTgcaattattctggttatctcacaacactccactaacgtatatgctgtaaattta
tcgTTggtatgcataatagtgagcttaaaaaaggTTtgacattttcaattgattcggacttcgTccggcTTTgtgaact
tcgtaTgatTgaatgatcgTTtagcgattaatagcaatacaaatattTgagttgctgTtaagcaaaagagatattacgtca
TTtatattacaTatcactattagtagacttgcaaacaaaggTTccagTTaaggataggTcaattggtatcttgacgtTga
attcagTTTTTaaagaccacacaacactctTgaataTgttcatttctgtaattcaattTTTTTatctTTTTgTTTgtatta
gTTcaaagtatagtaattcgTcgatctattgagccaatagcaacaatcgaatttcaaatatcatgtattcaacttcagaaa
aatttctaaacctgTaaattaggtaatatgcagcaattatcagcgatattTgactaatataggcgatgTtctagaaagtg
agacatagcttgctatattTgagttagttgctaTaatgaaggcTataaaaacgactgcctagcacacatttagaattagcct
aaacaaaattctaactgcttattgtaaaa

```

Figura 12: Secuencias reconocidas por diferentes factores de transcripción en la región 5' río arriba del gen *DhCTT1*: AP-1, GCN4, GCR1, ROX1, PHO4, MCM1, HSTF, BAS2, TBP.

Región 5' río arriba de *S. cerevisiae* del gen *ScCTT1*

La secuencia 5' río arriba de *S. cerevisiae* (figura 13) tiene algunas secuencias en común con la secuencia 5' río arriba de *D. hansenii*. Los factores que se unirían en común son: GCN4, BAS2, YAP1, HSTF y MCM1. Sin embargo, no se encontraron algunas de las secuencias de unión de factores de transcripción que se ubicaron en *D. hansenii*, como son: GCR1, ROX1, PHO4 y TBP.

Entre los factores que son exclusivos de la secuencia 5' río arriba de *S. cerevisiae* está SWI5, que induce la expresión de genes relacionados al cambio de tipo de apareamiento. Este factor sólo se expresa en las fases S, G₂ y M del ciclo celular (Herskowitz 1989). La secuencia de unión del

factor de transcripción Ace2p se encuentra en la secuencia y al igual que Swi5p, se expresa en G2 y ambas proteínas se concentran en el mismo momento en el núcleo (Moll *et al.* 1991; Dohrmann *et al.* 1992). Se ha probado que este factor es importante para la separación de las células al momento de la gemación, pero no lo es para el crecimiento polarizado (Bidlingmaier *et al.* 2001). La caja ECB (Early Cell Cycle), se encontró en la secuencia 5' río arriba de *S. cerevisiae* y regula genes que se expresan al inicio del ciclo celular. Esta caja se encuentra en los promotores de otros genes como *SWI4*; la delección de esta región, provoca el alargamiento de la fase G₁ del ciclo celular y un incremento en tamaño, por lo que también contribuye al cambio de fase G₁ a S (MacKay *et al.* 2001). Se ha reportado la interacción con los factores Yox1p y Yhp1p con Mcm1p que reprimen las cajas ECB, lo cual ayuda a restringir la expresión de genes con ECB a la fase M y G₁ (Pramila *et al.* 2002).

La secuencia de unión del factor ADR1 (represor de la alcohol deshidrogenasa 2) se relaciona con la activación de genes reprimidos por la glucosa (Young *et al.* 2003). Además, también se ha encontrado una función regulatoria en genes relacionados al metabolismo del glicerol, al uso de ácidos grasos y a la biogénesis de los peroxisomas (Simon *et al.* 1991; Tachibana *et al.* 2005).

La secuencia de STRE también fue ubicada, y los factores que se unen son Msn4p en conjunto con Msn2p (MartinezPastor *et al.* 1996), los cuales dirigen la respuesta al estrés de forma general, incluyendo la respuesta a estrés oxidativo (Gasch *et al.* 2000).

```

ttgccaagtacatagaatccacagtgcataaggtttatgagatgcttggaaagatgtacgatcgectgcactatattagtata
tttttcaggctttacaaaaccagaaagaattaccgactgtaataacttaatttccacgattttaatcgtatggcccgta
ggaaagaggaattttagtataaaaaaacctttgtctatcaaaacataaaaagaaaagaaaaaattaaattgaatagtc
gcttttagcatgaccacagtaataatagtaatacगतatcagcatgagctgctaaacataagaattgaattgtgttc
gctggtaagagaaaatagggtagcattagttgcgagatggaaaattaaaatagcgtcataaggtattccgacgttgaag
attaggggttgcaagtccgagaactaaactgccttcacgacgtcaaacttattgtatggtgacaataaaacgaattcaaga
agccagagatgatgaggaaccgatgacgaggcacatgggatagaacctccgttatctccattccgcgttgagcagctctc
ctgcgctgtttcacagagaccctaagccaagaccgcgacggccctctttttcaaggggatcaccgtaagggccaagcg
gtgaaattgcgatattgttctcctatcaatgatgagtacgtcgccgatccagaagggtattattgtcattgcccagctact
attcgtatgctgaaaaagtatagttcacttcaccctctggctgcaggctagcctagccgataatgccccgactccctcaa
caggtagaatttgtaaggattcgacgtagcctggacacattgtgcatttatcgtatcccctactgctacacgtataagaag
tcgttgccttacctctatttccagaactcaatcttgcgttacttgcccttattaaaaaaatccttctcttgtctcatgcca
ataagatcaatcagctcagcttcacaaa

```

Figura 13: Secuencias reconocidas por diferentes factores de transcripción en la región 5' río arriba del gen *ScCTT1*: **GCN4**, **BAS2**, **ACE2**, **ECB**, **STRE**, **HSTF**, **ADR1**, **LEU3**, **MCM1**, **SWI5**, **AP-1**, **ABF1**

DISCUSIÓN

La tipificación de las cepas de *S. cerevisiae* resultó de forma esperada y fue posible encontrar las cuatro cepas en la fase estacionaria después de 72 h de cultivo. Esto es debido a que entrando en crecimiento estacionario la producción de las ERO comienza a ser mayor y por lo tanto la respuesta es la transcripción y traducción de genes de respuesta a estrés oxidante; entre ellos los genes de la catalasa. Así, se confirmó que la tetrada 12 presentó las cepas silvestre, $\Delta cta1$, $\Delta ctt1$ y la acatalasémica.

Construcción y transformación del plásmido pRS316DhCTT1 en *S. cerevisiae*

Se realizó la extracción de DNA genómico de *D. hansenii*, para utilizarlo como DNA molde en la reacción de PCR y obtener el amplicón que tiene el gen *DhCTT1*. La extracción resultó muy sencilla, ya que se partió de una gran cantidad de células para obtener el DNA genómico; sin embargo no fue lo mismo con la PCR, que en un inicio, no producía ningún amplicón debido al rigor excesivo del primer programa y de la concentración de $MgCl_2$, que posteriormente fue ajustada para producir el amplicón en la masa esperada. El plásmido YCp50 que era el que se pensaba utilizar originalmente fue sustituido por pRS316 por las siguientes razones: El plásmido YCp50 tiene 7,950 pb, mucho más grande que pRS316 y esto hace que la transformación resulte más complicada, tanto en levaduras como en bacterias y además, al hacer el análisis de restricción para comprobar la identidad del plásmido, no dio la masa esperada y producía un patrón de bandas en el gel de agarosa después de la electroforesis que no correspondía al plásmido YCp50; posiblemente este tiene un inserto o se trata de un plásmido completamente distinto. Se procedió a realizar las digestiones con *Bam*H1 y *Sal*1, que cuando realizaba de forma individual no dieron ningún problema, pero al probar las dobles digestiones se tornó un poco problemático debido el hecho de elegir el *buffer* más adecuado para las dos enzimas, el cual resultó ser el *buffer* de *Bam*H1, en donde la enzima *Bam*H1 tiene el 100% de actividad y la enzima *Sal*1 solo tiene 50% de actividad, es por esto que se agregó el doble de *Sal*1 para compensar la diferencia.

Curvas de crecimiento

Para comprender lo observado en las curvas de crecimiento se requiere conocer que la levadura *S. cerevisiae* utiliza la glucosa en fase de crecimiento exponencial, catabolizándola hasta producir piruvato por la vía de la glucólisis. El piruvato puede entrar al ciclo de Krebs o pasar directamente a la fermentación alcohólica. La utilización aerobia de la glucosa aporta más ATP, a diferencia de la fermentación alcohólica; sin embargo, *S. cerevisiae* realiza la fermentación. A este fenómeno en el cual en presencia de oxígeno y glucosa se realiza la fermentación en lugar de la respiración se le conoce como efecto Crabtree positivo (De Deken 1966). Esto se explica del siguiente modo: ya que *Saccharomyces cerevisiae* crece principalmente en frutas en descomposición y el producto de la fermentación, el etanol, posee propiedades antibióticas, *S. cerevisiae* tiene una ventaja sobre otros organismos al producir etanol. Además, evita la activación de los mecanismos antioxidantes, ya que la fermentación no produce las ERO de manera concomitante. Se encontró que la catalasa T sólo se encontraba en los cultivos con glucosa como fuente de carbono en el crecimiento estacionario y no en el exponencial. En concordancia con lo encontrado por Segal (2011), esto ocurre porque cuando se agota la glucosa, se comienza a utilizar el etanol para generar energía. El producto del gen *ADH2* que codifica para la alcohol deshidrogenasa 2, es el responsable de convertir el etanol a acetaldehído (Ciriacy 1975). Esta reacción es dependiente del NAD^+ , el cual posteriormente se lleva a acetato para entrar en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, y luego a la cadena transportadora de electrones y a la fosforilación oxidativa, produciendo CO_2 y H_2O pero también ERO. De esta manera, se liga la fuente de carbono y el metabolismo con la cantidad de las ERO producida y con los genes que responden al estrés por las ERO, en este caso la catalasa *CTT1*. Cabe mencionar que en la fase de crecimiento exponencial, el etanol también protege contra el radical OH^\bullet , ya que impide el daño provocado al DNA (Imlay *et al.* 1988) y es también una razón para no encontrar catalasa T en crecimiento exponencial en *S. cerevisiae* con glucosa como fuente de carbono. En línea con lo anterior, en los experimentos en donde se añade mayor cantidad de glucosa al medio YPD, la represión de *CTT1* es mayor (Bissinger *et al.* 1989). De igual modo, *ADH2* en presencia de glucosa experimenta una represión de 200 veces, a diferencia de cuando la glucosa está ausente. Además, *ADH2* posee la secuencia del activador transcripcional *ADR1* en la región promotora (Denis *et al.* 1981), al igual que *CTT1* (resultado de esta tesis). Posiblemente el utilizar glucosa como fuente de carbono también previene la activación de factores como Yap1p que dirigen principalmente la respuesta a estrés oxidante y de factores

como Msn2 y Msn4 que responden al estrés de forma más general. De manera opuesta, *D. hansenii*, no es buena fermentando y la energía obtenida viene de la respiración. Cabe señalar que *D. hansenii* puede utilizar el etanol como fuente de carbono, lo que podría significar que tiene una alcohol deshidrogenasa tipo 2 o bien que existe una isoenzima que realiza la función de *ADH2*, o que el etanol es canalizado de una nueva forma a la producción de energía.

Las células acatalasémicas transformadas con pRS316::*DhCTT1* fueron capaces de alcanzar mayor biomasa y de acuerdo a lo anterior, es posible que este incremento sea resultado de que las células comienzan a respirar cuando se agota la glucosa. Entonces la catalasa T de *D. hansenii* confiere una mayor protección contra el H₂O₂ formado por la mitocondria. De manera que el H₂O₂ se podría difundir al resto de los compartimentos y provocar daños a las cepas no transformadas con el pRS316::*DhCTT1*. En las que sí lo tienen el daño puede ser menor. De modo que las células transformadas realizan el ciclo celular más veces, ya que pasan los puntos de control sin problemas debido a la eficiencia superior de la catalasa y a la eliminación de las ERO, que son capaces de dañar al DNA, degradar Cdc6p y activar MEC1, lo que conlleva a arrear el ciclo celular y si existe suficiente daño acumulado, iniciar el programa de muerte celular (Blanchard *et al.* 2002). De hecho, la actividad específica de los extractos de las transformantes es en promedio 22.7 veces mayor en YPD que la de las no transformadas. Este dato apunta a que la catalasa T tiene influencia directa en la cantidad de biomasa que logró alcanzar la cepa con pRS316::*DhCTT1*. Sin embargo, el incremento en la biomasa no se observó en YPD-NaCl, donde la diferencia en promedio es de sólo 1.3 veces mayor en las transformantes que en las cepas no transformadas.

Cuando las células fueron crecidas en medio YPD con NaCl 0.6 M, la actividad de la catalasa se incrementó para todas las cepas, las transformantes tuvieron una respuesta en el cambio de actividad específica similar a la que tiene *D. hansenii*, aumentado la actividad en 1.6 y 9 veces más al crecer en medio YPD ó YPD NaCl 0.6 M respectivamente. *D. hansenii* fue la que al final logró más biomasa en presencia de sal. Esto indica que el gen de la catalasa T de *D. hansenii* en presencia de NaCl sí se transcribe en *S. cerevisiae*, pero no es suficiente como para proporcionar una defensa óptima contra la sal. Se puede proponer que el estrés salino produce estrés osmótico. Se sabe que éste provoca deshidratación de las proteínas y cambios conformacionales, transporte celular y citoplasmático reducido, cambios en el pH citoplasmático y acumulación de iones tanto orgánicos como inorgánicos (Leopold 1986). Esto posiblemente provoque un funcionamiento

enzimático defectuoso, incluyendo enzimas que controlan los niveles de las ERO, deficiencias mitocondriales que entorpecen el transporte del ADP por la ADP/ATP translocasa y provoquen la disminución de la velocidad de la cadena transportadora favoreciendo la formación de $O_2^{\bullet-}$. Además de que también la producción de reductores orgánicos como NADH o FADH se debe ver afectada, entre otro tipo de fallas que causen disfuncionalidad a la mitocondria en *S. cerevisiae*. La consecuencia de esto sería no sólo la activación de genes contra la deshidratación, sino que también contra estrés oxidante, entre estos la catalasa. Así, si un organismo está adaptado al estrés osmótico y a sus consecuencias, no requiere la activación de enzimas que remuevan las ERO, ya que debe poseer mecanismos enzimáticos, no enzimáticos y fisiológicos que prevengan la deshidratación y las consecuencias del estrés osmótico, previniendo así el funcionamiento defectuoso de organelos y enzimas que favorezcan la producción de las ERO. Esto podría significar que *S. cerevisiae* tiene un incremento tan alto en la actividad de catalasa en comparación de *D. hansenii*, ya que es capaz de crecer a concentraciones de sal muy elevadas. Esto es, está completamente adaptada al estrés osmótico a diferencia de *S. cerevisiae* que no lo está. De hecho, la respuesta de las mitocondrias de *D. hansenii* al incremento de Na^+ y K^+ es un mejor funcionamiento, ya que el acoplamiento entre la cadena transportadora y la síntesis de ATP se incrementa a medida que estos iones incrementan, ya que previenen la transición de permeabilidad mitocondrial; esto refuerza el concepto de que *D. hansenii* es halófila. En contraste con *Saccharomyces cerevisiae* que creciendo a una concentración de NaCl de 0.6 M no sólo tendrá que lidiar contra el estrés salino sino que a su vez el sodio inducirá la apertura de MUC, reduciendo el acoplamiento entre el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, llevándola a un estado energético inferior. Al no responder de manera óptima a la presencia de sal, producirá de forma secundaria las ERO, provocando la respuesta al estrés oxidante. Posiblemente también ocurra la activación de factores, como Yap1p, que es específico de estrés oxidante. Es por esto que pRS316::*DhCTT1* no la protege del estrés salino de entrada, sino de sus consecuencias y su sola activación no compensa la falta de mejores adaptaciones al estrés salino y es por esto que no se observa una mejoría ni en la velocidad de crecimiento ni en la biomasa alcanzada entre las cepas transformantes y las que no están modificadas. Esta suposición se ve reforzada por el comportamiento del gen *DhCTT1*, en *S. cerevisiae* el incremento en la actividad es mayor que en *D. hansenii* y esto se refleja por la diferencia en la actividad específica.

Secuencias 5' río arriba

Las secuencias de unión que reconoce Yap1p que se une preferencialmente a la secuencia 5'-TTA[CG]TAA-3', se encuentran en ambas especies de levaduras en la región 5' río arriba; sin embargo, existe una diferencia fundamental, ya que en *S. cerevisiae*, esta secuencia comienza 61pb río arriba del codón de inicio y en *D. hansenii* comienza 989 pb río arriba del codón de inicio. Al ser Yap1p un factor de transcripción que induce la respuesta al estrés oxidante, y la catalasa una enzima con la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular, parece lógico que esta sea una enzima que deba ser regulada por Yap1p, además la SOD estaría eliminando el anión superóxido en condiciones de estrés oxidante, produciendo más peróxido de hidrógeno.

Sobre los factores MSN2 y MSN4, sólo el promotor de *S. cerevisiae* presenta cajas STRE, donde estos factores se unen. Inducen la activación de genes relacionados con el estrés de modo general, entre ellos, estrés osmótico, oxidante, estrés por calor y por condiciones limitantes de nutrientes (MartinezPastor *et al.* 1996). Entonces se presentan tres posibilidades: 1. La regulación de *DhCTT1* no es parte de la respuesta general a estrés, posiblemente, porque la generación de las ERO a partir de otros tipos de estrés, es una consecuencia secundaria en las levaduras que no poseen adaptaciones para controlar de manera eficaz las primeras condiciones adversas, como puede ser el caso de *S. cerevisiae*, que no es halófila, por lo que en *D. hansenii* el NaCl no provoca un gran incremento en la actividad de catalasa. 2. *D. hansenii* siempre tiene niveles altos de catalasa y en las condiciones que evolucionó, los niveles de las ERO no alcanzan niveles más altos que a los que ya está adaptada, siendo así posible pensar que puede tolerar los más altos niveles de las ERO que se pudieran presentar en su nicho biológico, por lo que quedaría fuera de la respuesta a estrés general. 3. La tercera y última idea es que puedan existir otros factores de transcripción que cumplan la función de respuesta a estrés general diferentes a Msn2p y Msn4p, los cuales no fueron detectados, ya que no está en los alcances de las bases de datos de factores de transcripción actuales, que son específicas de algunas especies en las que no se incluye *D. hansenii*.

Un elemento regulador que parece ser compartido entre ambas levaduras es GCN4, el cual induce la transcripción en la vía general de control de biosíntesis de aminoácidos. Esto podría estar evidenciando, que la falta de alguno o varios de los aminoácidos tiene como consecuencia la producción de las ERO, o por lo menos de peróxido de hidrógeno, ya sea por alguna vía alterna de

producción de aminoácidos con producción concomitante las ERO y/o que alguno o varios de los aminoácidos son importantes para la eliminación de especies reactivas de oxígeno. Esta suposición se sustenta en experimentos con *S. cerevisiae*, que al ser crecida en medio rico YPD con 2% de glucosa, donde la transcripción de *ScCTT1* es menor, a diferencia de cuando es crecida en medio mínimo con 2% de glucosa, pero con una cantidad muy baja de nitrógeno, la inducción en la transcripción de la catalasa T se incrementa (Bissinger *et al.* 1989). De hecho, la base es aun más sólida, ya que en *D. hansenii*, creciendo con una concentración de 2M NaCl, se produce un incremento en los niveles de mRNA del gen *DhARO4* (Calderón-Torres *et al.* 2006). *ARO4* codifica para la 3-desoxi – D-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintetasa, que es la primera enzima involucrada en la síntesis de aminoácidos aromáticos en la vía del shikimato, el cual también está bajo el control de GCN4 (Braus 1991) y se encontró que la tirosina adicionada puede disminuir los efectos de las ERO formadas, actuando como un antioxidante en *D. hansenii* creciendo en medio YPD con NaCl 2M, a esta conclusión llegó el equipo a partir de medir los niveles de 3-nitrotirosina (Calderón-Torres *et al.* 2011). Se sabe que la mitocondria de la levadura en condiciones de hipoxia produce NO⁻ a partir de nitrito, por acción de la citocromo c oxidasa; el NO⁻ puede después reaccionar con el oxígeno molecular o con el anión superóxido para formar peroxinitrito, el cual está implicado en la nitración de las proteínas (Ischiropoulos 1998); pero si no todo el superóxido reacciona para formar peroxinitrito, entonces puede ser tomado por la SOD y eventualmente por la catalasa T, además de que existe el atajo de Cadenas-Poderoso, en el cual se produce O₂⁻ a partir de •NO y ONOO⁻ conducido por la ubiquinona. Sin duda, hasta qué punto esta similitud existe entre *S. cerevisiae* y *D. hansenii* está por determinarse.

Mediante el análisis se detectó el elemento de unión de GCR1, inductor de la vía glucolítica, en la región 5' río arriba de *D. hansenii*. Partiendo de la premisa de que esta levadura crece muy lentamente en anaerobiosis y que la fermentación de la glucosa es pobre (Nakase *et al.* 1985), significa que el uso de la glucosa es por la vía aerobia y su producción de ATP es más dependiente de la mitocondria y la mitocondria produce las ERO en condiciones fisiológicas normales; es por esta razón que no resulta sorprendente encontrar la secuencia de GCR1 en la posible secuencia promotora de *D. hansenii*. Contrastando con *D. hansenii*, en *S. cerevisiae* no se detectó la secuencia reconocida por este inductor, lo cual se explica porque el efecto Crabtree es positivo (De Deken 1966). Además el análisis arrojó la secuencia que reconoce el factor ADR1 sólo en *S. cerevisiae*. Este factor se relaciona con la activación de genes reprimidos por la glucosa (Young *et al.* 2003),

con el metabolismo del glicerol, con el uso de ácidos grasos y la biogénesis de los peroxisomas (Simon *et al.* 1991; Tachibana *et al.* 2005). Como se mencionó arriba, la glucosa reduce la expresión de *CTT1*, pero pueden existir condiciones, como la adición de las ERO exógenas, en las que a pesar de la presencia de glucosa como fuente de carbono, se requiera la activación de *CTT1*. Por lo tanto, resulta crucial la activación de mecanismos antioxidantes y este factor podría estar funcionando de este modo con el gen *CTT1*. En la secuencia 5' río arriba de *D. hansenii* no se encontró la secuencia reconocida por este factor, posiblemente debido a que su presencia resultaría inútil ya que se encuentra la secuencia que reconoce GCR1.

Entre los elementos de regulación de la transcripción compartidos entre ambas levaduras, se encontró *BAS2*, el cual se sabe induce la transcripción de *HIS4* cuando existen niveles bajos de fosfato o adenina (Ticebaldwin *et al.* 1989). Ambos son componentes del ATP. La célula utiliza el fosfato principalmente para la síntesis de fosfolípidos y ácidos nucleicos; puede ser posible que los bajos niveles de fosfato, al tener que ser utilizar las reservas, para mantener el nivel de ácidos nucleicos y de fosfolípidos, comprometa de algún modo la síntesis de ATP. Uno de los factores que inducen la producción de las ERO por la mitocondria es la ausencia o bajos niveles de ADP. Adicionalmente mutantes en el gen *ADE2* de *S. cerevisiae* presentan fallas en la cadena respiratoria, y posiblemente también se de prioridad a la síntesis de ácidos nucleicos en lugar de a la síntesis de ATP. El factor *PHO4* que sólo se detectó en la secuencia de *D. hansenii*, *PHO4* activa transcripcionalmente genes relacionados con el metabolismo del fosfato cuando el P_i es escaso.

Los resultados de la búsqueda de secuencias de unión de factores de transcripción, ubicaron al factor *HSTF* o *HSF*, involucrado en la activación transcripcional de genes bajo condiciones de choque térmico. En un experimento utilizando *Aspergillus niger*, queda clara la existencia de una relación entre el estrés por calor y el estrés oxidativo; en el experimento se midió la actividad de catalasa y ésta alcanzó la máxima después de 8h a 60°C (Abrashev *et al.* 2008). De la misma manera, se puede suponer que para *D. hansenii* y *S. cerevisiae* el estrés térmico generaría estrés oxidativo de manera secundaria, y es por esta razón por la que estaría esta secuencia en la región 5' río arriba. De hecho la cepa Y7426 de *D. hansenii* es muy sensible a altas temperaturas, ya que a 33°C no es capaz de crecer.

Por último, se detectaron varias secuencias de unión de factores de transcripción relacionados al ciclo celular. Por ejemplo, *SWI5* que induce la expresión de genes relacionados al

cambio de tipo de apareamiento. Este factor sólo se encuentra en las fases S, G₂ y M del ciclo celular (Herskowitz 1989). Asimismo, Ace2p, de manera similar a Swi5p, se encuentra en G₂ y ambos factores se concentran en el mismo momento en el núcleo (Moll *et al.* 1991; Dohrmann *et al.* 1992). Se ha probado que Ace2p es importante para la separación de las células al momento de la gemación, pero no lo es para el crecimiento polarizado (Bidlingmaier *et al.* 2001). La importancia de estas secuencias en la región promotora de *S. cerevisiae* puede o no deberse a la producción de las ERO o de peróxido de hidrógeno en algún momento de las fases S, G₂ y M. La caja ECB, se encontró en la secuencia 5' río arriba de *S. cerevisiae*, y regula genes que se expresan al inicio del ciclo celular y también contribuye al cambio de fase G₁ a S; así, hay secuencias que inducen la transcripción de *CTT1* en cualquier fase del ciclo celular y de alguna manera podría decirse que lo hacen constitutivamente; quizá las variaciones de los niveles de estos factores proporcionen niveles diferentes de activación transcripcional. Puede existir la posibilidad de que la activación de *CTT1* durante G₁ este relacionada con la cantidad de proteínas que se sintetizan en dicha fase, pudiéndose producir peróxido de hidrógeno desde el retículo endoplásmico por la subunidad Ero1p de la maquinaria formadora de enlaces disulfuro (Gross *et al.* 2006) y como consecuencia se incrementen los niveles de la catalasa.

CONCLUSIONES

1. El gen que codifica a la catalasa T de *Debaryomyces hansenii* complementó una mutante acatalasémica de *Saccharomyces cerevisiae*.
2. El gen fue expresado de manera heteróloga bajo el control del promotor de *D. hansenii* utilizando la maquinaria transcripcional de *S. cerevisiae*.
3. La actividad del producto de *DhCTT1* es mayor que la actividad de catalasa de la cepa silvestre y las cepas que expresan una u otra catalasa de *S. cerevisiae*.
4. En medio rico YPD, la cepa transformada alcanza una concentración de biomasa mayor que las cepas silvestre y las que expresan una u otra catalasa de *S. cerevisiae*.
5. A pesar de que el análisis de secuencias a las que se pueden unir factores de transcripción exhiben diferencias importantes entre el promotor de *ScCTT1* y el de *DhCTT1*, la expresión se llevó a cabo.
6. Las regiones encontradas en las secuencias promotoras del gen *CTT1* de ambos organismos, se relacionan estrechamente con sus diferencias biológicas.

REFERENCIAS

- Abbrashev, R. I., S. B. Pashova, L. N. Stefanova, S. V. Vassilev, P. A. Dolashka-Angelova y M. B. Angelova (2008). "Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* 26." Canadian journal of microbiology **54**(12): 977-983.
- Appenzeller-Herzog, C. (2011). "Glutathione- and non-glutathione-based oxidant control in the endoplasmic reticulum." Journal of cell science **124**(6): 847-855.
- Avery, A. M. y S. V. Avery (2001). "*Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases." The Journal of biological chemistry **276**(36): 33730-33735.
- Balasubramanian, B., C. V. Lowry y R. S. Zitomer (1993). "The Rox1 Repressor of the *Saccharomyces-Cerevisiae* Hypoxic Genes Is a Specific DNA-Binding Protein with a High-Mobility-Group Motif." Molecular and cellular biology **13**(10): 6071-6078.
- Bandlow, W. (1972). "Membrane separation and biogenesis of the outer membrane of yeast mitochondria." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **282**(0): 105-122.
- Barbusinski, K. (2009). "Fenton Reaction - Controversy Concerning the Chemistry." Ecological Chemistry and Engineering S-Chemia I Inzynieria Ekologiczna S **16**(3): 347-358.
- Barja, G. (2007). "Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies." Rejuvenation research **10**(2): 215-224.
- Bayr, H. (2005). "Reactive oxygen species." Critical care medicine **33**(12): S498-S501
410.1097/1001.CCM.0000186787.0000164500.0000186712.
- Berben, G., M. Legrain, V. Gilliquet y F. Hilger (1990). "The yeast regulatory gene PHO4 encodes a helix-loop-helix motif." Yeast **6**(5): 451-454.
- Bidlingmaier, S., E. L. Weiss, C. Seidel, D. G. Drubin y M. Snyder (2001). "The Cbk1p pathway is important for polarized cell growth and cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*." Molecular and cellular biology **21**(7): 2449-2462.
- Bissinger, P. H., R. Wieser, B. Hamilton y H. Ruis (1989). "Control of *Saccharomyces cerevisiae* catalase T gene (CTT1) expression by nutrient supply via the RAS-cyclic AMP pathway." Molecular and cellular biology **9**(3): 1309-1315.
- Blanchard, F., M. E. Rusiniak, K. Sharma, X. Sun, I. Todorov, M. M. Castellano, C. Gutierrez, H. Baumann y W. C. Burkans (2002). "Targeted destruction of DNA replication protein Cdc6 by cell death pathways in mammals and yeast." Molecular biology of the cell **13**(5): 1536-1549.
- Bossis, G. y F. Melchior (2006). "SUMO: regulating the regulator." Cell division **1**: 13.
- Boveris, A., N. Oshino y B. Chance (1972). "The cellular production of hydrogen peroxide." The Biochemical journal **128**(3): 617-630.
- Bozonet, S. M., V. J. Findlay, A. M. Day, J. Cameron, E. A. Veal y B. A. Morgan (2005). "Oxidation of a eukaryotic 2-Cys peroxiredoxin is a molecular switch controlling the transcriptional response to increasing levels of hydrogen peroxide." The Journal of biological chemistry **280**(24): 23319-23327.
- Braus, G. H. (1991). "Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway." Microbiological Reviews **55**(3): 349-370.
- Brown, A. D. y J. R. Simpson (1972). "Water Relations of Sugar-tolerant Yeasts: the Role of Intracellular Polyols." Journal of general microbiology **72**(3): 589-591.

- Butinar, L., S. Santos, I. Spencer-Martins, A. Oren y N. Gunde-Cimerman (2005). "Yeast diversity in hypersaline habitats." FEMS microbiology letters **244**(2): 229-234.
- Cabrera-Orefice, A., S. Guerrero-Castillo, L. A. Luevano-Martinez, A. Peña y S. Uribe-Carvajal (2010). "Mitochondria from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* (halophilic organelles?)." Journal of bioenergetics and biomembranes **42**(1): 11-19.
- Cadenas, E. y K. J. A. Davies (2000). "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging." Free Radical Biology and Medicine **29**(3,4): 222-230.
- Calderón-Torres, M., D. E. Castro, P. Montero y A. Peña (2011). "DhARO4 induction and tyrosine nitration in response to reactive radicals generated by salt stress in *Debaryomyces hansenii*." Yeast **28**(10): 733-746.
- Calderón-Torres, M., A. Peña y P. E. Thomé (2006). "DhARO4, an amino acid biosynthetic gene, is stimulated by high salinity in *Debaryomyces hansenii*." Yeast **23**(10): 725-734.
- Cao, C., Y. Leng y D. Kufe (2003). "Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response." The Journal of biological chemistry **278**(32): 29667-29675.
- Cao, C., Y. Leng, X. Liu, Y. Yi, P. Li y D. Kufe (2003). "Catalase is regulated by ubiquitination and proteosomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine kinases." Biochemistry **42**(35): 10348-10353.
- Cavalheiro, R. A., F. Fortes, J. Borecký, V. C. Faustino, A. Z. Schreiber y A. E. Vercesi (2004). "Respiration, oxidative phosphorylation, and uncoupling protein in *Candida albicans*." Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.] **37**(10): 1455-1461.
- Cave, A. C., A. C. Brewer, A. Narayanapanicker, R. Ray, D. J. Grieve, S. Walker y A. M. Shah (2006). "NADPH oxidases in cardiovascular health and disease." Antioxidants & redox signaling **8**(5-6): 691-728.
- Cherry, J. M., E. L. Hong, C. Amundsen, R. Balakrishnan, G. Binkley, E. T. Chan, K. R. Christie, M. C. Costanzo, S. S. Dwight, S. R. Engel, D. G. Fisk, J. E. Hirschman, B. C. Hitz, K. Karra, C. J. Krieger, S. R. Miyasato, R. S. Nash, J. Park, M. S. Skrzypek, M. Simison, S. Weng y E. D. Wong (2011). "Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast." Nucleic Acids Research.
- Cherry, J. M., E. L. Hong, C. Amundsen, R. Balakrishnan, G. Binkley, E. T. Chan, K. R. Christie, M. C. Costanzo, S. S. Dwight, S. R. Engel, D. G. Fisk, J. E. Hirschman, B. C. Hitz, K. Karra, C. J. Krieger, S. R. Miyasato, R. S. Nash, J. Park, M. S. Skrzypek, M. Simison, S. Weng y E. D. Wong (2012). "Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast." Nucleic Acids Research **40**(D1): D700-D705.
- Ciriacy, M. (1975). "Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Two loci controlling synthesis of the glucose-repressible ADH II." Molecular & general genetics : MGG **138**(2): 157-164.
- Cohen, G., F. Fessl, A. Traczyk, J. Rytka y H. Ruis (1985). "Isolation of the catalase A gene of *Saccharomyces cerevisiae* by complementation of the *cta1* mutation." Molecular & general genetics : MGG **200**(1): 74-79.
- Davenport, R. (1980). In Biology and activities of yeasts. London, Academic Press.
- de Andrade, R., T. Gemelli, D. Rojas, C. Funchal, C. Dutra-Filho y C. Wannmacher (2012). "Tyrosine impairs enzymes of energy metabolism in cerebral cortex of rats." Molecular and cellular biochemistry **364**(1): 253-261.
- De Deken, R. H. (1966). "The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast." Journal of general microbiology **44**(2): 149-156.
- Delaunay, A., A. D. Isnard y M. B. Toledano (2000). "H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor." The EMBO journal **19**(19): 5157-5166.

- Denis, C. L., M. Ciriacy y E. T. Young (1981). "A positive regulatory gene is required for accumulation of the functional messenger RNA for the glucose-repressible alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of molecular biology **148**(4): 355-368.
- Devlin, C., K. Ticebaldwin, D. Shore y K. T. Arndt (1991). "Rap1 Is Required for Bas1/Bas2-Dependent and Gcn4-Dependent Transcription of the Yeast His4 Gene." Molecular and cellular biology **11**(7): 3642-3651.
- Díaz, A. (2003). "La Estructura de las Catalasas." Revista de Educación Bioquímica **22**(2).
- Díaz, A., R. A. Muñoz-Clares, P. Rangel, V.-J. Valdes y W. Hansberg (2005). "Functional and structural analysis of catalase oxidized by singlet oxygen." Biochimie **87**(2): 205-214.
- Dohrmann, P. R., G. Butler, K. Tamai, S. Dorland, J. R. Greene, D. J. Thiele y D. J. Stillman (1992). "Parallel pathways of gene regulation: homologous regulators SWI5 and ACE2 differentially control transcription of HO and chitinase." Genes & development **6**(1): 93-104.
- Dowling, D. K. y L. W. Simmons (2009). "Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution." Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **276**(1663): 1737-1745.
- Draculic, T., I. W. Dawes y C. M. Grant (2000). "A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Molecular microbiology **36**(5): 1167-1174.
- Dujon, B., D. Sherman, G. Fischer, P. Durrens, S. Casaregola, I. Lafontaine, J. de Montigny, C. Marck, C. c. Neuv√@glise, E. Talla, N. Goffard, L. Frangeul, M. Aigle, V. r. Anthouard, A. Babour, V. Barbe, S. Barnay, S. Blanchin, J.-M. Beckerich y E. Beyne (2004). "Genome evolution in yeasts." Nature **430**(6995): 35-44.
- Eisenmann, D. M., C. Dollard y F. Winston (1989). "SPT15, the gene encoding the yeast TATA binding factor TFIID, is required for normal transcription initiation in vivo." Cell **58**(6): 1183-1191.
- Elble, R. y B. K. Tye (1991). "Both activation and repression of a-mating-type-specific genes in yeast require transcription factor Mcm1." Proceedings of the National Academy of Sciences **88**(23): 10966-10970.
- Ferreira, J. L. R., D. M. Barros, L. A. Geracitano, G. Fillmann, C. E. Fossa, E. A. de Almeida, M. de Castro Prado, B. R. A. Neves, M. V. B. Pinheiro y J. M. Monserrat (2012). "In vitro exposure to fullerene C60 influences redox state and lipid peroxidation in brain and gills from *Cyprinus carpio* (Cyprinidae)." Environmental Toxicology and Chemistry **31**(5): 961-967.
- Fisher, N., P. G. Bray, S. A. Ward y G. A. Biagini (2007). "The malaria parasite type II NADH:quinone oxidoreductase: an alternative enzyme for an alternative lifestyle." Trends in parasitology **23**(7): 305-310.
- Forrest, S. I., C. F. Robinow y M.-A. Lachance (1987). "Nuclear behaviour accompanying ascus formation in *Debaryomyces polymorphus*." Canadian journal of microbiology **33**(11): 967-970.
- Fragoso, M. A., V. Fernandez, R. Forteza, S. H. Randell, M. Salathe y G. E. Conner (2004). "Transcellular thiocyanate transport by human airway epithelia." The Journal of physiology **561**(Pt 1): 183-194.
- Fridovich, I. (1995). "Superoxide radical and superoxide dismutases." Annual review of biochemistry **64**: 97-112.
- Fukuda, K., M. Maebuchi, H. Takata y N. Gunge (1997). "The Linear Plasmid pDHL1 from *Debaryomyces hansenii* Encodes a Protein Highly Homologous to the pGKL1-Plasmid DNA Polymerase." Yeast **13**(7): 613-620.
- Gasch, A. P., P. T. Spellman, C. M. Kao, O. Carmel-Harel, M. B. Eisen, G. Storz, D. Botstein y P. O. Brown (2000). "Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes." Molecular biology of the cell **11**(12): 4241-4257.
- Go, Y.-M., J. J. Gipp, R. T. Mulcahy y D. P. Jones (2004). "H2O2-dependent Activation of GCLC-ARE4 Reporter Occurs by Mitogen-activated Protein Kinase Pathways without Oxidation of Cellular Glutathione or Thioredoxin-1." Journal of Biological Chemistry **279**(7): 5837-5845.

- Gough, J., K. Karplus, R. Hughey y C. Chothia (2001). "Assignment of Homology to Genome Sequences using a Library of Hidden Markov Models that Represent all Proteins of Known Structure." Journal of molecular biology **313**(4): 903-919.
- Grace, S. C. (1990). "Phylogenetic distribution of superoxide dismutase supports an endosymbiotic origin for chloroplasts and mitochondria." Life sciences **47**(21): 1875-1886.
- Gross, E., C. S. Sevier, N. Heldman, E. Vitu, M. Bentzur, C. A. Kaiser, C. Thorpe y D. Fass (2006). "Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(2): 299-304.
- Gu, X. y J. E. Manautou (2012). "Molecular mechanisms underlying chemical liver injury." Expert Reviews in Molecular Medicine **14**: null-null.
- Guerrero-Castillo, S., D. Araiza-Olivera, A. Cabrera-Orefice, J. Espinasa-Jaramillo, M. Gutierrez-Aguilar, L. A. Luevano-Martinez, A. Zepeda-Bastida y S. Uribe-Carvajal (2011). "Physiological uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. Studies in different yeast species." Journal of bioenergetics and biomembranes **43**(3): 323-331.
- Gunge, N., K. Fukuda, S. Morikawa, K. Murakami, M. Takeda y A. Miwa (1993). "Osmophilic linear plasmids from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*." Current genetics **23**(5): 443-449.
- Halliwell, B. y H. Poulsen (2006). Oxidative Stress
Cigarette Smoke and Oxidative Stress. B. B. Halliwell and H. E. Poulsen, Springer Berlin Heidelberg: 1-4.
- Han, D., F. Antunes, R. Canali, D. Rettori y E. Cadenas (2003). "Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol." The Journal of biological chemistry **278**(8): 5557-5563.
- Hansen, R. E., D. Roth y J. R. Winther (2009). "Quantifying the global cellular thiol-disulfide status." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(2): 422-427.
- Haynes, C. M., E. A. Titus y A. A. Cooper (2004). "Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death." Molecular cell **15**(5): 767-776.
- Herbig, A. F. y J. D. Helmann (2001). "Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA." Molecular microbiology **41**(4): 849-859.
- Herskowitz, I. (1989). "A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast." Nature **342**(6251): 749-757.
- Hinnebusch, A. G. (1988). "Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiological Reviews **52**(2): 248-273.
- Holland, M. J., T. Yokoi, J. P. Holland, K. Myambo y M. A. Innis (1987). "The Gcr1 Gene Encodes a Positive Transcriptional Regulator of the Enolase and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Gene Families in *Saccharomyces-Cerevisiae*." Molecular and cellular biology **7**(2): 813-820.
- Hwang, C., A. J. Sinskey y H. F. Lodish (1992). "Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum." Science **257**(5076): 1496-1502.
- Imlay, J. A., S. M. Chin y S. Linn (1988). "Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro." Science **240**(4852): 640-642.
- Imlay, J. A. y S. Linn (1988). "DNA damage and oxygen radical toxicity." Science **240**(4857): 1302-1309.
- Ischiropoulos, H. (1998). "Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species." Archives of biochemistry and biophysics **356**(1): 1-11.
- Jennings (1993). Stress Tolerance of Fungi, Taylor & Francis.
- Jones, D. P. (2006). "Redefining oxidative stress." Antioxidants & redox signaling **8**(9-10): 1865-1879.

- Kasting, J. F. (1993). "Earth's early atmosphere." *Science* **259**(5097): 920-926.
- Kiss, P. J., J. Knisz, Y. Zhang, J. Baltrusaitis, C. D. Sigmund, R. Thalmann, R. J. Smith, E. Verpy y B. Banfi (2006). "Inactivation of NADPH oxidase organizer 1 results in severe imbalance." *Current biology : CB* **16**(2): 208-213.
- Klotz, M. G., G. R. Klassen y P. C. Loewen (1997). "Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases." *Molecular Biology and Evolution* **14**(9): 951-958.
- Korshunov, S. S., V. P. Skulachev y A. A. Starkov (1997). "High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria." *FEBS letters* **416**(1): 15-18.
- Kowaltowski, A. J., A. D. Costa y A. E. Vercesi (1998). "Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain." *FEBS letters* **425**(2): 213-216.
- Krauss, S., C. Y. Zhang y B. B. Lowell (2005). "The mitochondrial uncoupling-protein homologues." *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**(3): 248-261.
- Kurtzman, C. P. y J. W. Fell (1998). *The Yeasts - A Taxonomic Study*, Elsevier Science.
- Lardinois, O. M. y P. G. Rouxhet (1994). "Characterization of hydrogen peroxide and superoxide degrading pathways of *Aspergillus niger* catalase: a steady-state analysis." *Free radical research* **20**(1): 29-50.
- Larsson, C. y L. Gustafsson (1987). "Glycerol production in relation to the ATP pool and heat production rate of the yeasts *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* during salt stress." *Archives of microbiology* **147**(4): 358-363.
- Laurent, T. C., E. C. Moore y P. Reichard (1964). "Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin, the Hydrogen Donor from *Escherichia Coli* B." *The Journal of biological chemistry* **239**: 3436-3444.
- Lee, J., C. Godon, G. Lagniel, D. Spector, J. Garin, J. Labarre y M. B. Toledano (1999). "Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast." *Journal of Biological Chemistry* **274**(23): 16040-16046.
- Lee, J. W. y J. D. Helmann (2006). "The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation." *Nature* **440**(7082): 363-367.
- Leopold, A. C. (1986). *Membranes, metabolism, and dry organisms*, Comstock Pub. Associates.
- Liochev, S. I. y I. Fridovich (1999). "Superoxide and iron: partners in crime." *IUBMB life* **48**(2): 157-161.
- Llorente, B., P. Durrens, A. Malpertuy, M. Aigle, F. o. Artiguenave, G. I. Blandin, M. Bolotin-Fukuhara, E. Bon, P. Brottier, S. Casaregola, B. Dujon, J. de Montigny, A. e. L.√@pingle, C. c. Neuv√@glise, O. Ozier-Kalogeropoulos, S. Potier, W. Saurin, F. Tekaia, C. Toffano-Nioche, M. W√@solowski-Louvel, P. Wincker, J. Weissenbach, J.-L. Souciet y C. Gaillardin (2000). "Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 20. Evolution of gene redundancy compared to *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS letters* **487**(1): 122-133.
- Llorente, P., D. Marquina, A. Santos, J. M. Peinado y I. Spencer-Martins (1997). "Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines." *Applied and environmental microbiology* **63**(3): 1165-1167.
- Longo, V. D., E. B. Gralla y J. S. Valentine (1996). "Superoxide Dismutase Activity Is Essential for Stationary Phase Survival in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Biological Chemistry* **271**(21): 12275-12280.
- Longo, V. D., J. Mitteldorf y V. P. Skulachev (2005). "Programmed and altruistic ageing." *Nat Rev Genet* **6**(11): 866-872.
- Luevano-Martinez, L. A., E. Moyano, M. G. de Lacoba, E. Rial y S. Uribe-Carvajal (2010). "Identification of the mitochondrial carrier that provides *Yarrowia lipolytica* with a fatty acid-induced and nucleotide-sensitive uncoupling protein-like activity." *Biochimica et biophysica acta* **1797**(1): 81-88.

MacKay, V. L., B. Mai, L. Waters y L. L. Breeden (2001). "Early Cell Cycle Box-Mediated Transcription of CLN3 and SWI4 Contributes to the Proper Timing of the G1-to-S Transition in Budding Yeast." Molecular and cellular biology **21**(13): 4140-4148.

Madeo, F., E. Herker, S. Wissing, H. Jungwirth, T. Eisenberg y K. U. Frohlich (2004). "Apoptosis in yeast." Current opinion in microbiology **7**(6): 655-660.

Madigan, M. T., J. M. Martinko, D. P. Clark y D. A. Stahl (2010). Brock Biology of Microorganisms, Benjamin Cummings.

Marquina, D., J. Barroso, A. Santos y J. M. Peinado (2001). "Production and characteristics of *Debaryomyces hansenii* killer toxin." Microbiological Research **156**(4): 387-391.

MartinezPastor, M. T., G. Marchler, C. Schuller, A. MarchlerBauer, H. Ruis y F. Estruch (1996). "The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE)." Embo Journal **15**(9): 2227-2235.

McCord, J. M. y I. Fridovich (1969). "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)." The Journal of biological chemistry **244**(22): 6049-6055.

McCord, J. M., B. B. Keele, Jr. y I. Fridovich (1971). "An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **68**(5): 1024-1027.

Merdinger, E. y E. M. Devine, Jr. (1965). "Lipids of *Debaryomyces Hansenii*." Journal of bacteriology **89**: 1488-1493.

Michaelis, L. (1946). "Fundamentals of oxidation and respiration." American scientist **34**(4): 573-596.

Moll, T., G. Tebb, U. Surana, H. Robitsch y K. Nasmyth (1991). "The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5." Cell **66**(4): 743-758.

Moreno, J. C. y T. J. Visser (2007). "New phenotypes in thyroid dysmorphogenesis: hypothyroidism due to DUOX2 mutations." Endocrine development **10**: 99-117.

Muller, E. G. (1991). "Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle." The Journal of biological chemistry **266**(14): 9194-9202.

Nakase, T. y M. Suzuki (1985). "Taxonomic studies on *Debaryomyces*

hansenii (Zopf) Lodder et Kreger-Van Rij and related

species. II. Practical discrimination and nomenclature." The Journal of general and applied microbiology **31**(1): 71-86.

Nakase, T., M. Suzuki, H. J. Phaff y C. P. Kurtzman (1998). 26 - *Debaryomyces* Lodder & Kreger-van Rij Nom. Cons. The Yeasts (Fourth Edition). P. K. Cletus and W. F. Jack. Amsterdam, Elsevier: 157-173.

Nauseef, W. M. (2008). "Biological roles for the NOX family NADPH oxidases." The Journal of biological chemistry **283**(25): 16961-16965.

Nobre, M. F. y M. S. d. Costa (1985). "The accumulation of polyols by the yeast *Debaryomyces hansenii* in response to water stress." Canadian journal of microbiology **31**(11): 1061-1064.

Paffenholz, R., R. A. Bergstrom, F. Pasutto, P. Wabnitz, R. J. Munroe, W. Jagla, U. Heinzmann, A. Marquardt, A. Bareiss, J. Laufs, A. Russ, G. Stumm, J. C. Schimenti y D. E. Bergstrom (2004). "Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in *Nox3*, encoding an NADPH oxidase." Genes & development **18**(5): 486-491.

Pearl, R. (2011). The Rate of Living, BiblioBazaar.

Perrone, G. G., S. X. Tan y I. W. Dawes (2008). "Reactive oxygen species and yeast apoptosis." Biochimica et biophysica acta **1783**(7): 1354-1368.

- Pozniakovsky, A. I., D. A. Knorre, O. V. Markova, A. A. Hyman, V. P. Skulachev y F. F. Severin (2005). "Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast." The Journal of cell biology **168**(2): 257-269.
- Pramila, T., S. Miles, D. GuhaThakurta, D. Jemiolo y L. L. Breeden (2002). "Conserved homeodomain proteins interact with MADS box protein Mcm1 to restrict ECB-dependent transcription to the M/G1 phase of the cell cycle." Genes & development **16**(23): 3034-3045.
- Pratico, D. (2002). "Lipid Peroxidation and the Aging Process." Sci. Aging Knowl. Environ. **2002**(50): re5-.
- Prieto, S., F. Bouillaud y E. Rial (1995). "The mechanism for the ATP-induced uncoupling of respiration in mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." The Biochemical journal **307** (Pt 3): 657-661.
- Prieto, S., F. Bouillaud, D. Ricquier y E. Rial (1992). "Activation by ATP of a proton-conducting pathway in yeast mitochondria." European journal of biochemistry / FEBS **208**(2): 487-491.
- Qi, H., T. K. Li, D. Kuo, E. K. A. Nur y L. F. Liu (2003). "Inactivation of Cdc13p triggers MEC1-dependent apoptotic signals in yeast." The Journal of biological chemistry **278**(17): 15136-15141.
- Rabilloud, T., M. Heller, F. Gasnier, S. Luche, C. Rey, R. Aebersold, M. Benahmed, P. Louisot y J. Lunardi (2002). "Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for in vivo overoxidation of peroxiredoxins at their active site." The Journal of biological chemistry **277**(22): 19396-19401.
- Radi, R., G. Peluffo, M. N. Alvarez, M. Naviliat y A. Cayota (2001). "Unraveling peroxynitrite formation in biological systems." Free radical biology & medicine **30**(5): 463-488.
- Ratledge, C. (2002). "Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms." Biochemical Society transactions **30**(Pt 6): 1047-1050.
- Sablina, A. A., A. V. Budanov, G. V. Ilyinskaya, L. S. Agapova, J. E. Kravchenko y P. M. Chumakov (2005). "The antioxidant function of the p53 tumor suppressor." Nature medicine **11**(12): 1306-1313.
- Scandalios, J. G. (2002). "The rise of ROS." Trends in biochemical sciences **27**(9): 483-486.
- Segal-Kischinevsky, C., B. Rodarte-Murguía, V. Valdés-López, G. Mendoza-Hernández, A. González y L. Alba-Lois (2011). "The Euryhaline Yeast *Debaryomyces hansenii* has Two Catalase Genes Encoding Enzymes with Differential Activity Profile." Current microbiology **62**(3): 933-943.
- Sevier, C. S. y C. A. Kaiser (2002). "Formation and transfer of disulphide bonds in living cells." Nature reviews. Molecular cell biology **3**(11): 836-847.
- Sherman, D. J., T. Martin, M. Nikolski, C. Cayla, J.-L. Souciet y P. Durrens (2009). "Génolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes." Nucleic Acids Research **37**(suppl 1): D550-D554.
- Sies, H. (1985). Oxidative stress, Academic Press.
- Simon, M., G. Adam, W. Rapatz, W. Spevak y H. Ruis (1991). "The *Saccharomyces-Cerevisiae* Adr1 Gene Is a Positive Regulator of Transcription of Genes Encoding Peroxisomal Proteins." Molecular and cellular biology **11**(2): 699-704.
- Sorger, P. K. y H. R. B. Pelham (1987). "Purification and Characterization of a Heat-Shock Element Binding-Protein from Yeast." Embo Journal **6**(10): 3035-3041.
- Spevak, W., F. Fessl, J. Rytka, A. Traczyk, M. Skoneczny y H. Ruis (1983). "Isolation of the catalase T structural gene of *Saccharomyces cerevisiae* by functional complementation." Molecular and cellular biology **3**(9): 1545-1551.
- Storz, G., L. A. Tartaglia y B. N. Ames (1990). "Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation." Science **248**(4952): 189-194.

- Sugita, T. y T. Nakase (1999). "Non-universal usage of the leucine CUG codon and the molecular phylogeny of the genus *Candida*." Systematic and Applied Microbiology **22**(1): 79-86.
- Tachibana, C., J. Y. Yoo, J. B. Tagne, N. Kacherovsky, T. I. Lee y E. T. Young (2005). "Combined global localization analysis and transcriptome data identify genes that are directly coregulated by *Adr1* and *Cat8*." Molecular and cellular biology **25**(6): 2138-2146.
- Ticebaldwin, K., G. R. Fink y K. T. Arndt (1989). "Bas1 Has a Myb Motif and Activates His4 Transcription Only in Combination with Bas2." Science **246**(4932): 931-935.
- Tu, B. P. y J. S. Weissman (2004). "Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences." The Journal of cell biology **164**(3): 341-346.
- Turrens, J. F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." The Journal of physiology **552**(2): 335-344.
- Turrens, J. F., B. A. Freeman, J. G. Levitt y J. D. Crapo (1982). "The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles." Archives of biochemistry and biophysics **217**(2): 401-410.
- Vainshtein, B. K., W. R. Melik-Adamyany, V. V. Barynin, A. A. Vagin, A. I. Grebenko, V. V. Borisov, K. S. Bartels, I. Fita y M. G. Rossmann (1986). "Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at 2.0 Å resolution." Journal of molecular biology **188**(1): 49-61.
- van der Klei, I. J., H. Yurimoto, Y. Sakai y M. Veenhuis (2006). "The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1763**(12): 1453-1462.
- Veal, E. A., A. M. Day y B. A. Morgan (2007). "Hydrogen peroxide sensing and signaling." Molecular cell **26**(1): 1-14.
- Wagner, E., S. Luche, L. Penna, M. Chevallet, A. Van Dorsselaer, E. Leize-Wagner y T. Rabilloud (2002). "A method for detection of overoxidation of cysteines: peroxiredoxins are oxidized in vivo at the active-site cysteine during oxidative stress." The Biochemical journal **366**(Pt 3): 777-785.
- Watson, W. H. y D. P. Jones (2003). "Oxidation of nuclear thioredoxin during oxidative stress." FEBS letters **543**(1-3): 144-147.
- Winterbourn, C. C. y D. Metodiewa (1999). "Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide." Free radical biology & medicine **27**(3-4): 322-328.
- Wood, P. M. (1987). "The two redox potentials for oxygen reduction to superoxide." Trends in biochemical sciences **12**(0): 250-251.
- Young, E. T., K. M. Dombek, C. Tachibana y T. Ideker (2003). "Multiple Pathways Are Co-regulated by the Protein Kinase *Snf1* and the Transcription Factors *Adr1* and *Cat8*." Journal of Biological Chemistry **278**(28): 26146-26158.
- Zheng, M., F. Aslund y G. Storz (1998). "Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation." Science **279**(5357): 1718-1721.