



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Cuantificación de los niveles relativos de las catalasas Cta y
Ctt de *Debaryomyces hansenii* mediante su fusión a un
reportero fluorescente

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A:

Brandon Bustos García



DIRECTORA DE TESIS:
Química Viviana Escobar Sánchez
Ciudad Universitaria, Cd. Mx.
(2019)



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.

1. Datos del alumno

Bustos

García

Brandon

63 03 20 53

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

No. de cuenta 312236313

2. Datos del tutor

Q.

Escobar

Sánchez

Viviana

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Peraza

Reyes

Carlos Leonardo

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Fiordelisio

Coll

Tatiana

5. Datos del sinodal 3

Dr.

González

Flores

James Enrique

6. Datos del sinodal 4

Dra.

Ongay

Larios

Laura María

7. Datos del trabajo escrito

Cuantificación de los niveles relativos de las catalasas CTA y CTT de *Debaryomyces hansenii* mediante su fusión a un reportero fluorescente

69 p

2019

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica a cargo de la Dra. Claudia Segal-Kischinevzky, del Departamento de Biología Celular en la Facultad de Ciencias de la UNAM, bajo la tutoría de la Química Viviana Escobar Sánchez.

Agradezco especialmente a la Dra. Tatiana Fiordelisio Coll, responsable de la Unidad de Microscopía de la Facultad de Ciencias, y al Maestro en Ciencias José Alfredo Jiménez Medina por el apoyo técnico brindado para manipular el microscopio confocal.

Asimismo, agradezco a la Dra. Laura Ongay-Larios, responsable de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, y al Dr. James González Flores por el apoyo técnico que me dieron para analizar las muestras mediante citometría de flujo.

Agradecimientos

A mis padres, que siempre han estado para escucharme cuando los necesito, que me han acompañado en todos los logros y en todos los tropiezos. Todo lo que hago es por ustedes y para ustedes, son mi gran motor en la vida. Ojalá jamás dejen de sentirse orgullosos de mí, porque yo siempre voy a estar orgulloso de las personas que ustedes son. Los amo infinitamente.

A mis hermanos, Edwin y Brenda, que nunca dejan de creer en mí, siempre están dispuestos a ayudarme en lo que necesite y me ven como su ejemplo, aunque la mayoría de las veces no me merezco esa distinción. A pesar de todas nuestras diferencias, ustedes son mis mejores amigos en la vida.

A mis amigos: Alejandro, Franklin, Carlos, con quienes puedo ser yo mismo sin inhibiciones y sin juicios, que siempre que nos vemos me saludan con un abrazo sincero y que, aunque tal vez sin darse cuenta, siempre fueron un ejemplo para mí y me impulsan todos los días a ser una mejor versión de mí mismo. Aunque no soy el mejor amigo, ustedes son los únicos que nunca se rindieron conmigo. Los quiero sinceramente y les agradezco su amistad con todo mi ser.

A mi novia, la persona con quien más he compartido en estos cuatro años: Ester. Has estado conmigo desde el principio de la carrera, cuando no tenía la menor idea de lo que quería, y sigues conmigo ahora, que encontré algo que me llena el corazón y la mente y que quiero hacer siempre: aprender. Gracias por las llamadas en la madrugada para asegurarte de que estuviera haciendo mi tarea o que siguiera estudiando en lugar de quedarme dormido. Gracias por no dejarme olvidar de lo que soy capaz, por siempre creer en mí y por crecer siempre conmigo. No tienes idea de cuánto te debe la persona en la que me he convertido. Te amo.

A la Dra. Laura Vargas Parada, la profesora que consiguió que me enamorara de la Biología. Su clase fue sin duda lo mejor de mi licenciatura, y gracias a usted me di cuenta de que esto era lo que quería hacer en la vida. Le agradezco infinitamente su amistad, sus consejos, los libros y, principalmente, que siempre me salude con una gran sonrisa.

A todos mis compañeros del laboratorio: Alberto, Tamara, Ileana, porque nunca se negaron a escucharme hablar de lo que fuera o a ayudarme con la menor de las cosas. Especialmente, a Daniel, Román y James, con quienes siempre puedo filosofar acerca de la vida entera y no dudan en pasar horas platicando conmigo o en llevarme la contraria. Su amistad me ha hecho crecer muchísimo y los quiero mucho más.

Finalmente, y con mucho énfasis, a mis jefas: Viviana y Claudia. Gracias por enseñarme algo nuevo todos los días, por ponerme en mi lugar cuando fue necesario y porque siempre fueron entusiastas con respecto a mi trabajo y mi formación. Les agradezco de corazón su guía y su apoyo académicos, pero les agradezco más todavía su amistad y su cariño. Las quiero mucho.

INTRODUCCIÓN	1
<i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> : UN ORGANISMO CON LIMITACIONES	1
LAS LEVADURAS NO CONVENCIONALES	2
<i>DEBARYOMYCES HANSENI</i> : LA “CENICIENTA” DE LAS LEVADURAS NO CONVENCIONALES	3
APLICACIONES DE <i>DEBARYOMYCES HANSENI</i> EN BIOTECNOLOGÍA.....	4
<i>DEBARYOMYCES HANSENI</i> Y EL ESTRÉS OXIDANTE.....	5
MÉTODOS AVANZADOS PARA LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS	11
¿QUÉ METODOLOGÍA ELEGIR PARA DETECTAR FLUORESCENCIA?	12
JUSTIFICACIÓN.....	15
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO	17
MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO	18
<i>Protocolo: Curvas de crecimiento.....</i>	<i>19</i>
<i>Cálculo del tiempo de duplicación.....</i>	<i>19</i>
BIOLOGÍA MOLECULAR.....	19
<i>Protocolo: extracción de DNA genómico de S. cerevisiae o D. hansenii.....</i>	<i>19</i>
DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y VERIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS	20
<i>Oligonucleótidos</i>	<i>20</i>
<i>Construcción de fusiones por PCR de solapamiento y clonación en plásmidos.....</i>	<i>21</i>
<i>DhCTA-yEC y DhCTT-yEC.....</i>	<i>22</i>
<i>yECitrine.....</i>	<i>23</i>
<i>Purificación de productos de PCR.....</i>	<i>23</i>
<i>Digestión de productos de PCR y vectores.....</i>	<i>24</i>
<i>Ligación de vector e insertos.....</i>	<i>24</i>
<i>Transformación en E. coli XL1Blue</i>	<i>24</i>
<i>Selección de transformantes y verificación de plásmidos con inserto mediante digestión enzimática..</i>	<i>25</i>
<i>Protocolo: obtención de DNA plasmídico en pequeña escala (miniprep)</i>	<i>25</i>
<i>Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....</i>	<i>26</i>
<i>Transformación de Saccharomyces cerevisiae.....</i>	<i>26</i>
PRUEBA RÁPIDA DE ACTIVIDAD DE CATALASA	27
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE CATALASA.....	27
<i>Obtención de extracto crudo de proteína.....</i>	<i>27</i>
<i>Protocolo: Cuantificación de proteína en extractos crudos por el método de Bradford.....</i>	<i>28</i>
<i>Protocolo: Ensayo de la actividad específica de catalasa</i>	<i>28</i>
DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE MÉTODOS FLUOROMÉTRICOS.....	29
<i>Citometría de flujo.....</i>	<i>29</i>
<i>Preparación de muestras para microscopía confocal (células vivas).....</i>	<i>29</i>
RESULTADOS	31
DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y VERIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS	31
<i>Construcción de insertos.....</i>	<i>31</i>
Fusiones catalasa-yECitrine	31
yECitrine: control positivo para la detección de fluorescencia.....	33
<i>Digestión enzimática y clonación en vectores de expresión</i>	<i>34</i>
<i>Selección de clonas positivas mediante digestión enzimática</i>	<i>35</i>
TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA ACATALASÉMICA DE <i>S. CEREVISIAE</i> CON LOS PLÁSMIDOS CONSTRUIDOS	36
CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS COMPLEMENTADAS HETERÓLOGAMENTE	37
<i>Caracterización de la cepa complementadas heterológamente con DhCTT o DhCTT-yEC.....</i>	<i>37</i>

La complementación con <i>DhCTT</i> no tiene efecto en la dinámica de crecimiento	37
Las cepas complementadas con <i>DhCTT</i> no presentan actividad de catalasa	39
Las células <i>DhCtt</i> -positivas sólo son detectables en medio con etanol y sal.....	42
La proteína <i>DhCtt</i> está presente en todos los medios de cultivo, aunque en niveles muy bajos.	43
<i>Caracterización de la cepa complementadas heterológamente con DhCTA o DhCTA-yEC.....</i>	<i>44</i>
La complementación con <i>DhCTA</i> favorece la dinámica de crecimiento cuando el etanol es la única fuente de carbono	44
Las cepas transformadas con <i>DhCTA</i> presentan niveles elevados de actividad de catalasa elevada en los medios con etanol como fuente de carbono	46
El porcentaje de células Cta positivas se incrementa en presencia de etanol en el medio de cultivo	48
La expresión de <i>DhCTA</i> presenta un perfil de variegado	49
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	60
<i>DhCTT</i>	60
<i>DhCTA</i>	61
REFERENCIAS	62

INTRODUCCIÓN

***Saccharomyces cerevisiae*: un organismo con limitaciones**

Las levaduras son sin duda uno de los grupos de organismos mejor estudiados en la actualidad; se han descrito en la literatura más de 1,500 especies diferentes [Kurtzman y Fell, 2006], y una de las principales razones es el hecho de que muchas tienen un enorme impacto en actividades humanas tales como la producción de alimentos y bebidas desde hace miles de años [Sicard y Legras, 2011].

A pesar de que se puede hacer un listado extenso de las diferentes especies que tienen importancia económica o social, una de ellas ha destacado históricamente: la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura se ha ganado su lugar, particularmente, gracias a una característica de gran interés para los humanos: la capacidad de producir etanol en grandes cantidades. Este organismo participa en la elaboración de pan, vino, cerveza, preparaciones fermentadas de fruta o leche y otras bebidas alcohólicas. Sin embargo, hace falta hablar mucho más de ella para ponerse en contexto.

El primer genoma eucarionte en ser secuenciado fue el de *S. cerevisiae*, el cual fue liberado electrónicamente en 1996 [Cherry *et al.*, 1998]. Bajo la premisa de que al tratarse de un eucarionte los hallazgos producidos por el estudio de su biología pueden extrapolarse a otros organismos como plantas y animales, esta levadura se convirtió rápidamente en uno de los sistemas predilectos para el trabajo de investigación en Biología [Legras *et al.*, 2007].

Actualmente, se le considera indiscutiblemente como un organismo modelo para el estudio de las células eucariontes por diferentes razones: 1) su genoma contiene un porcentaje de hasta el 12% de genes homólogos al del humano, 2) muchas de las proteínas codificadas en su genoma tienen la misma función que sus homólogas humanas, 3) la manipulación genética de este organismo es relativamente sencilla, de bajo costo y está bien estandarizada y 4) las bases de datos existentes para este organismo son las más completas entre los diferentes modelos eucariontes [de la Torre-Ruiz *et al.*, 2015].

A pesar del amplio beneficio que hemos obtenido de esta levadura en muchos sectores, las aplicaciones industriales más recientes en materia de biotecnología tales como la producción de bioetanol, la biorremediación de suelos y aguas y la producción de nanomateriales, han puesto en evidencia algunas de sus limitaciones [Radecka *et al.*, 2015; Bonugli-Santos *et al.*, 2015; Beeler y Singh, 2016]. Estos procesos representan diferentes retos que *S. cerevisiae* no puede superar, tales como la presencia de un elevado contenido de sales en el medio de cultivo o compuestos citotóxicos que inhiben su crecimiento [Palmqvist y Hahn-

Hägerdal, 2000; Almeida, Modig y Petersson, 2007; Basso, Basso y Rocha, 2011; Taylor *et al.*, 2012].

Las capacidades limitadas de *S. cerevisiae* para crecer y desarrollarse en medios de cultivo con características extremas han llevado a diferentes grupos de investigación a explorar la fisiología de otros organismos como alternativa.

Las levaduras no convencionales

Aunque la definición de lo que es una levadura no convencional ha cambiado a lo largo del tiempo, actualmente todas aquellas levaduras distintas de *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* son catalogadas como levaduras no convencionales [Prista *et al.*, 2016]. Sin embargo, esta clasificación resulta bastante vaga, particularmente en términos fisiológicos, pues se trata de un grupo sumamente heterogéneo.

La evolución de muchas de estas levaduras ha sido independiente de *S. cerevisiae* [Souciet *et al.*, 2009], por lo que diferentes autores proponen que habrán desarrollado mecanismos para sobrevivir a condiciones ambientales muy diferentes a las que enfrenta comúnmente la levadura modelo y que, por ende, dichos mecanismos no estarán presentes en ésta [Membré, Kubackza y Ge, 1999; Martorell *et al.*, 2007, Dujon, 2010].

Las levaduras no convencionales representan una enorme biodiversidad dentro del grupo de los hongos, y muchas de ellas portan rasgos que resultan interesantes para la industria, como la capacidad de utilizar fuentes de carbono complejas, desarrollarse en ambientes con concentraciones elevadas de metales pesados o con temperaturas extremas, entre otras.

Entre los ejemplos más reconocidos de estos organismos encontramos a las levaduras *Kluyveromyces marxianus* y *Ogatea polymorpha*, que son capaces de crecer a temperaturas por encima de los 50 °C [Banat, Nigam y Marchant, 1992; Shin, Hong y Bae, 1996], a *Dekkera bruxellensis*, que tolera concentraciones de hasta 16% de etanol en el medio [Echeverrigaray *et al.*, 2013] y a *Zygosaccharomyces rouxii*, como el ejemplo más común de una levadura osmo- y halotolerante [Martorell *et al.*, 2007]. El conocimiento en torno a estas levaduras es considerablemente amplio y muchas de ellas se usan actualmente en diferentes procesos biotecnológicos.

Por otro lado, en este grupo también se incluyen organismos cuyas cualidades no han sido tan ampliamente estudiadas. En ocasiones, estas levaduras poseen rasgos tan peculiares que hacen extremadamente difícil su estudio en los laboratorios. Tal es el caso la levadura *Debaryomyces hansenii*, la cual presenta diferentes cualidades moleculares y fisiológicas que la hacen un organismo con elevado potencial biotecnológico, pero que también hacen que su estudio sea particularmente complicado [Prista *et al.*, 2005].

***Debaryomyces hansenii*: la “Cenicienta” de las levaduras no convencionales**

Debaryomyces hansenii es una levadura perteneciente al grupo de los *Saccharomycetes* y es considerado un organismo extremófilo, ya que posee rasgos de osmo-, xero-, halo-, quimio- y criotolerancia [Breuer y Harms, 2006].

Históricamente se le ha clasificado como una levadura marina debido a que Norkrans [1966] la aisló por primera vez del mar. Sin embargo, actualmente se reconoce que es una especie ubicua, pues es capaz de desarrollarse en todo tipo de alimentos, tan salados como salmueras, quesos y jamones, o tan dulces como helados y mermeladas [van der Walt *et al.*, 1997; Tokuoka *et al.*, 1985], todos con baja actividad de agua.

D. hansenii es capaz de utilizar un amplio espectro de fuentes de carbono, las cuales metaboliza generalmente a través de la respiración aerobia [Prista *et al.*, 2016], puede crecer a temperaturas de hasta 0 °C y soportar un intervalo amplio de acidez/alcalinidad, pues prolifera en medios con valores de pH entre 3.6 y 10, tolera la presencia de metales pesados, pesticidas e hidrocarburos aromáticos [Prista *et al.*, 2005; Segal-Kischinevzky *et al.*, 2011], tiene una capacidad extrema de sintetizar y almacenar lípidos (por lo que también es considerada una levadura oleaginosa), e incluso es capaz de producir toxinas tipo “killer” (micocinas) capaces de inhibir el crecimiento de otras levaduras patógenas como *Candida albicans* [Banjara *et al.*, 2016]. Asimismo, una de las cualidades más reconocidas de *D. hansenii* es su capacidad de tolerar altos niveles de salinidad en el medio, siendo capaz de crecer incluso a concentraciones de NaCl de 25% (4.3 M) [Butinar *et al.*, 2005]. El interés de algunos grupos de investigación en esta característica ha permitido identificar diferentes elementos que juegan un papel importante, tales como la composición de la membrana (proporción esterol:fosfolípidos) [Turk *et al.*, 2007], los mecanismos de transporte de sodio, potasio y glicerol [Lages *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2011], etc.

El genoma de *D. hansenii* fue secuenciado por el consorcio Génolevures en el 2004. Se identificaron 7 cromosomas de entre 1.25 Mb y 2.33 Mb con un tamaño total de 12.12 Mb. Uno de los hallazgos más importantes reportados en ese trabajo es que parece ser la levadura con mayor capacidad codificante, con aproximadamente el 79% del genoma ocupado en marcos de lectura abiertos. Además, su genoma también es el más redundante conocido hasta la fecha, con un porcentaje de 49.2% de su genoma duplicado [Dujon *et al.*, 2004]. Actualmente, en su genoma están anotados 6642 genes que corresponden a 6272 proteínas diferentes. A pesar del gran avance que implicó la secuenciación del genoma, son muy pocos los genes o proteínas de esta levadura los que están bien caracterizados y en su mayoría están implicados en los mecanismos de tolerancia al estrés osmótico [Prista *et al.*, 2016].

Además, por si fuera poco, *D. hansenii* también pertenece al llamado “clado CTG”. Esto quiere decir que tiene un código genético alterno; es decir que, a diferencia de la mayoría de los organismos, el codón CUG se traduce por serina en lugar de leucina, debido a la presencia de un tRNA especial y único de este clado [Miranda *et al.*, 2006]. A pesar de estas (y más) cualidades que le confieren un enorme potencial biotecnológico, el estudio de esta levadura es particularmente difícil y en ocasiones costoso.

Todas las especies del género *Debaryomyces* son levaduras perfectamente homotáticas con un ciclo de vida primordialmente haploide y se reproducen vegetativamente por gemación multilateral. La reproducción sexual ocurre únicamente por conjugación, heterogámica o isogámica, y es muy poco común [Nakase *et al.*, 1994]. Por esta razón, no ha sido posible realizar cruces y mucho menos generar mutantes auxotróficas que permitan utilizar técnicas estándar de transformación genética por complementación; aunque se han reportado diferentes aproximaciones, todas han probado tener una muy baja eficiencia [Dohmen *et al.*, 1991; Klein *et al.*, 1988; Ricaurte *et al.*, 1999]. A esto hay que sumar el hecho de que *D. hansenii* no tiene importancia en el sector clínico, lo cual disminuye considerablemente el esfuerzo invertido en su estudio.

Aplicaciones de *Debaryomyces hansenii* en biotecnología

La osmotolerancia de *D. hansenii* resulta de gran interés en biotecnología porque permite trabajar en condiciones *cuasi*-no-estériles o con altas concentraciones de producto/educto, lo cual reduce dramáticamente los costos de producción en muchos sectores de la industria [Breuer y Harms, 2006]. Cuando se crece a esta levadura en medio con alta osmolaridad, es capaz de producir una variedad de solutos compatibles de utilidad industrial para balancear la presión osmótica del medio, tales como el glicerol y/o arabitol [Nobre y da Costa, 1985]. El glicerol, por ejemplo, se utiliza para la producción de productos con un alto valor añadido, como fibras sintéticas, cosméticos, surfactantes, lubricantes, pinturas, etc.

Por otro lado, su capacidad de metabolizar diferentes fuentes de carbono la hace muy útil en otros procesos más avanzados. La producción de biodiesel, que se basa en la transesterificación de triglicéridos, arroja como un co-producto grandes cantidades de glicerol; sin embargo, el glicerol obtenido de este proceso contiene muchas impurezas como sales, metanol y ácidos grasos residuales. *D. hansenii* es capaz de crecer en medios con tales impurezas y además metabolizar el glicerol, transformándolo en arabitol y xilitol, que a su vez se utilizan como edulcorantes hipocalóricos y reductores de caries [Krawczyk, 1996; Lin y Li, 2011].

Otro ejemplo popular del uso de esta levadura se encuentra en la industria vinícola. La fermentación del mosto de uva es un proceso largo que ocurre gracias a la actividad biológica de diferentes organismos, entre los cuales protagonizan las levaduras. Durante las primeras etapas de la fermentación, se desarrollan levaduras con una baja capacidad fermentativa y a medida que la concentración

de etanol se incrementa, ceden el paso a levaduras con mayores capacidades fermentativas y con mayor tolerancia al etanol, la mayoría pertenecientes al género *Saccharomyces* [Flores *et al.*, 2000; Fia *et al.*, 2005]. Las primeras etapas de la fermentación son especialmente problemáticas debido a que es muy complicado controlar el crecimiento de las cepas iniciadoras, además del peligro siempre latente de la contaminación de los cultivos. Actualmente, *D. hansenii* se está utilizando como una cepa iniciadora de la fermentación gracias a su actividad “killer”, que limita el crecimiento de otros microorganismos no deseados en el cultivo [Fia *et al.*, 2005; Jolly *et al.*, 2006].

En la industria cosmética, por otro lado, se han utilizado extractos obtenidos de *D. hansenii* como fuente de una enzima antioxidante, la superóxido dismutasa (Cu-Zn SOD), para la producción de cremas faciales y suplementos para el cuidado de la piel, gracias a que diferentes autores reportaron que algunas cepas de este organismo producían esta enzima en muy grandes cantidades con respecto a *S. cerevisiae* [Hernández-Saavedra y Ochoa, 1999; García-González y Ochoa, 1999; Ochoa y Vázquez-Juárez, 2004; Ochoa y Latisnere-Barragán, 2006].

La cualidad de expresar una enzima con un papel importante en la respuesta al estrés oxidante en grandes cantidades ha resultado de especial interés para nuestro grupo de trabajo, pues reveló una característica hasta entonces poco explorada sobre este organismo: la capacidad de contender contra grandes cantidades de especies reactivas del oxígeno.

***Debaryomyces hansenii* y el estrés oxidante**

En todos los organismos aerobios, la utilización del oxígeno como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria tiene como consecuencia la formación de diferentes especies parcialmente reducidas de este elemento con una naturaleza altamente reactiva, tales como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, conocidas como especies reactivas del oxígeno (ERO) (figura 1).

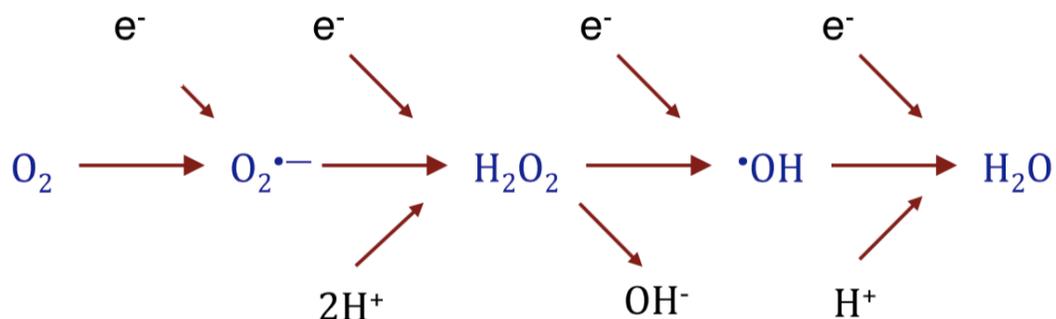


Figura 1. Vía monovalente de reducción del oxígeno molecular. En azul se muestran las diferentes especies del oxígeno producidas por la adición o la pérdida secuencial de electrones y/o protones. De izquierda a derecha: oxígeno molecular, anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y agua. Tomada de Segal-Kischinevzky [2011].

Cuando se habla de estrés oxidante, nos referimos a todo un fenómeno que involucra la capacidad de las células de percibir, responder y protegerse a sí mismas de un desbalance en la concentración de las ERO [Toledano *et al.*, 2003]. Existe una enorme cantidad de reportes en la literatura respecto al potencial de las ERO para producir daño a las células al reaccionar prácticamente con todas las biomoléculas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos) provocando diferentes procesos patológicos o incluso la muerte celular [Lushchak, 2014]. Es por ello que las células han desarrollado diferentes mecanismos, enzimáticos o no enzimáticos, para controlar la producción y degradación de estos compuestos.

Como ejemplos de enzimas antioxidantes tenemos a las superóxido dismutasas, las catalasas, las peroxidasas y las tioredoxinas; además, las células también producen compuestos antioxidantes como el ascorbato, el tocoferol y el glutatión. Todos estos elementos actúan secuencial y ordenadamente de acuerdo a la intensidad del estrés o del daño generado por las ERO (figura 2). La mayor parte del conocimiento que se tiene a nivel bioquímico y molecular con respecto a la respuesta antioxidante en células eucariontes se ha producido al trabajar con la levadura *S. cerevisiae*; aunque se han realizado algunos trabajos en levaduras no convencionales como *Candida albicans* [Moradas-Ferreira y Costa, 2000; Ikner y Shiozaki, 2005], poco se sabe acerca de la naturaleza tolerante de *D. hansenii* al estrés oxidante.

Teniendo en mente las capacidades de *D. hansenii* para ocupar diferentes nichos ecológicos, muchos de ellos artificiales, se ha propuesto que esta levadura debe poseer rasgos que le permitan contender contra diferentes tipos de estrés metabólico; por ejemplo, el estrés oxidante. El primer estudio acerca de la respuesta de *D. hansenii* al estrés oxidante fue reportado en el 2009. En este trabajo se probó que esta levadura es más sensible a diferentes agentes que producen estrés oxidante al compararla con *S. cerevisiae*. Sin embargo, cuando la levadura es crecida en un medio con NaCl, estos efectos parecen revertirse, sugiriendo que la sal tiene un efecto protector contra el estrés oxidante en *D. hansenii* [Navarrete *et al.*, 2009].

Siguiendo la pista de los niveles elevados de SOD en este organismo [Ochoa y Latisnere-Barragán, 2006] y la baja actividad basal de las peroxidasas [Navarrete *et al.*, 2009], Segal-Kischinevzky y colaboradores propusieron que si *D. hansenii* producía grandes cantidades de H₂O₂ como resultado de la actividad de SOD, otras enzimas como las catalasas podrían estar degradando el peróxido excedente, por lo que se dieron a la tarea de explorar el comportamiento de estas enzimas.

El genoma de *D. hansenii* tiene anotados dos genes que codifican para dos catalasas: *DhCTA* y *DhCTT*, homólogos a los de *S. cerevisiae*: *ScCTA* y *ScCTT*, respectivamente. Los ensayos de viabilidad por choque de peróxido realizados por Segal-Kischinevzky en el 2011 probaron que *D. hansenii* tiene una resistencia a este compuesto mucho mayor a la de *S. cerevisiae*, presumiblemente debido a la fuerte actividad de catalasa. En soporte de esta hipótesis, en este trabajo se

encontró que *D. hansenii* presenta un nivel de actividad total de catalasa mayor al que presenta *Saccharomyces cerevisiae* en medio rico (YPD) con y sin cloruro de sodio, tanto en la fase de crecimiento exponencial como en la fase de crecimiento estacionario, sin distinguir entre la actividad de *DhCta* o *DhCtt* (figura 3, A y D, respectivamente). A su vez, mediante zimogramas de actividad de catalasa se demostró que la levadura expresa ambas proteínas, aunque estas presentan un perfil de actividad diferencial. De forma interesante, ensayos de *Northern blot* indicaron que la variación en los niveles de mRNA de ambas catalasas no se relaciona directamente con los perfiles de actividad en diferentes condiciones de cultivo o la fase del crecimiento, sugiriendo que los productos de estos genes pueden estar sometidos a procesos de regulación post-transcripcional y/o post-traduccional.



Figura 2. Niveles de respuesta contra el estrés oxidante. Los mecanismos de respuesta al estrés oxidante pueden englobarse en una etapa de respuesta inmediata, que se encuentra activa de forma constitutiva (círculo amarillo) y en tres líneas de defensa que se activarán según la intensidad del daño generado por las especies reactivas del oxígeno. ERO= Especies reactivas del oxígeno; SOD= Superóxido dismutasa; Gpx= Glutación peroxidasa; Trx= Tiorredoxina reductasa.

Debido al fenotipo de resistencia al estrés oxidante que exhibe *D. hansenii* en comparación con *S. cerevisiae*, en los últimos años nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en caracterizar la regulación de *DhCTA* y *DhCTT*. Para ello, y debido a la imposibilidad de utilizar técnicas convencionales de biología molecular en *D. hansenii*, se produjo una cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* para expresar los

genes de ambas catalasas de manera heteróloga mediante su clonación en un plásmido.

Se clonaron de forma independiente los genes de las catalasas de *D. hansenii*, incluyendo la región promotora y el terminador, en el vector pRS316 para su expresión en la cepa acatalasémica de *S. cerevisiae*. El plásmido que contiene a la catalasa A lo construyó Diego Noriega durante el desarrollo de su tesis de licenciatura; su trabajo probó que la cepa que expresaba dicha catalasa presentaba un menor tiempo de duplicación con respecto a la cepa acatalasémica [Noriega, 2012]. A su vez, el plásmido que contiene a la catalasa T lo construyó Román A. Castillo. Entre los principales resultados de su tesis, se identificó que la expresión de esta catalasa proporciona a las células transformadas la capacidad de alcanzar una mayor biomasa en medio rico YPD con respecto a la cepa sin catalasas [Castillo-Díaz, 2013].

Por otro lado, con el fin de retomar los resultados observados por Segal-Kischinevzky respecto a los niveles de actividad de catalasa en diferentes medios de cultivo [2011], Miguel A. García realizó ensayos de actividad específica de catalasa para cada una de las transformantes. Él encontró que en fase de crecimiento estacionario la actividad específica de la cepa que expresa *DhCTA* en medio con glucosa o etanol es 5 veces menor en presencia de sal. Contrariamente, en el caso de la cepa que expresa *DhCTT*, se encontró que la actividad es hasta 19 veces más alta en presencia de sal [García-Campos, 2014]. Estos resultados sugirieron que a diferencia de las catalasas de *S. cerevisiae* [Izawa *et al.*, 1996], *DhCTA* y *DhCTT* no tienen una función redundante, pues responden de forma diferente a las condiciones del cultivo: la presencia de sal inhibe la actividad de *DhCta*, pero produce un aumento significativo en la actividad de *DhCtt* cuando son expresadas heterológicamente en la cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* (figura 3, B y C, respectivamente). De estos resultados se ha logrado identificar un comportamiento muy interesante: **la dinámica de respuesta** en los distintos medios de cultivo de la cepa que expresa el gen *DhCTA* asemeja la respuesta de *D. hansenii*, mientras que la respuesta de la cepa que expresa el gen *DhCTT* se parece a la que despliega *S. cerevisiae*, independientemente de la magnitud (figura 3).

A pesar de los avances logrados en estos años, la expresión heteróloga de estos genes ha presentado diferentes complicaciones, en particular con *DhCTT*. Hemos encontrado que la expresión de *DhCTT* en la cepa acatalasémica es inestable y que no todas las clonas transformadas con el plásmido que contiene este gen presentan actividad de catalasa. Aunque el análisis del comportamiento de estos genes en *D. hansenii* originalmente sugirió que las diferencias en la actividad se debían a fenómenos de regulación post-transcripcional [Segal-Kischinevzky, 2011], debemos recordar que esta levadura responde de forma muy distinta a *S. cerevisiae* ante las diferentes condiciones de estrés. Variables como la presencia/ausencia de elementos de regulación en las secuencias promotoras, o bien la producción de factores de transcripción específicos en respuesta al estrés

podrían afectar el comportamiento de estos genes cuando son expresados heterológamente en la cepa acatalasémica de *S. cerevisiae*.

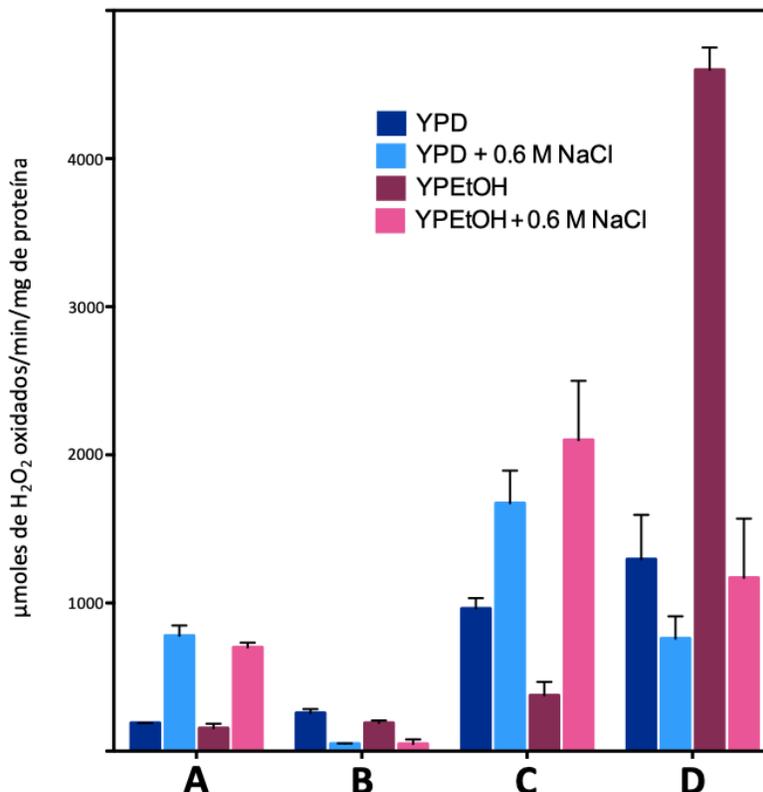


Figura 3. Actividad específica de catalasa por cepa en diferentes medios de cultivo en fase de crecimiento estacionario. Los datos mostrados en esta gráfica son resultado de los trabajos previamente realizados en el laboratorio, todos citados en este trabajo. A = *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, B = *S. cerevisiae* acatalasémica complementada con el gen *DhCTA* contenido en el plásmido pRS316, C = *S. cerevisiae* acatalasémica complementada con el gen *DhCTT* contenido en el plásmido pRS316, D = *Debaryomyces hansenii* silvestre.

Para verificar que la pérdida de la actividad de catalasa en las transformantes no tuviera que ver con un reconocimiento deficiente del promotor de *DhCTT* en *S. cerevisiae*, de la Fuente-Colmenares construyó quimeras de los genes de la catalasa T de ambas levaduras. Fusionó el ORF de *DhCTT* con el promotor de *ScCTT* (*Sc/DhCTT*), y por otro lado fusionó el ORF de *ScCTT* al promotor de la catalasa T de *D. hansenii* (*Dh/ScCTT*). Las cepas de *S. cerevisiae* acatalasémica transformadas con las construcciones que contenían al promotor de *D. hansenii* no mostraron actividad de catalasa a menos que fueran pre-tratadas con H_2O_2 , mientras que aquellas que portaban al promotor nativo de la catalasa T de *S. cerevisiae* sí presentaron actividad en medio con y sin sal sin necesidad de una pre-inducción [de la Fuente-Colmenares, 2017]. Este trabajo arrojó nuevas hipótesis: 1) las cepas transformantes tienen un problema para reconocer al promotor de *DhCTT*, 2) las condiciones en que se ha trabajado no son las adecuadas para inducir la expresión de esta catalasa, probablemente debido a que la respuesta que despliega *S. cerevisiae* en estas condiciones de estrés no se parece a la de *D. hansenii* ó 3) los niveles de expresión son muy bajos,

provocando que los niveles de actividad de catalasa se encuentren por debajo del límite de detección del ensayo de actividad específica de catalasa que usamos [Aebi, 1984 y Segal-Kischinevsky, 2011].

Sea cual el caso, los ensayos realizados hasta el momento en el laboratorio no tienen el alcance necesario para determinar cuál o cuáles de estas 3 posibles hipótesis es la correcta. La expresión génica es un fenómeno complejo que responde a diferentes estímulos, los cuales pueden afectar el proceso a diferentes niveles. Las células pueden regular qué genes serán transcritos y cuáles mensajeros serán traducidos mediante diferentes mecanismos que involucran el procesamiento del RNA y las proteínas para controlar su actividad (figura 4). En este sentido, el estudio detallado del fenómeno de regulación requiere la implementación de diversas técnicas que nos permitan analizar cada punto del proceso.

En este caso particular, hace falta determinar los niveles de RNA mensajero y detectar directamente la presencia de estas proteínas en las cepas transformantes para saber si las diferencias en la actividad se deben a variaciones en el proceso de la transcripción, durante la traducción de los mensajeros, o bien si estas proteínas están siendo activadas o inactivadas post-traduccionalmente.

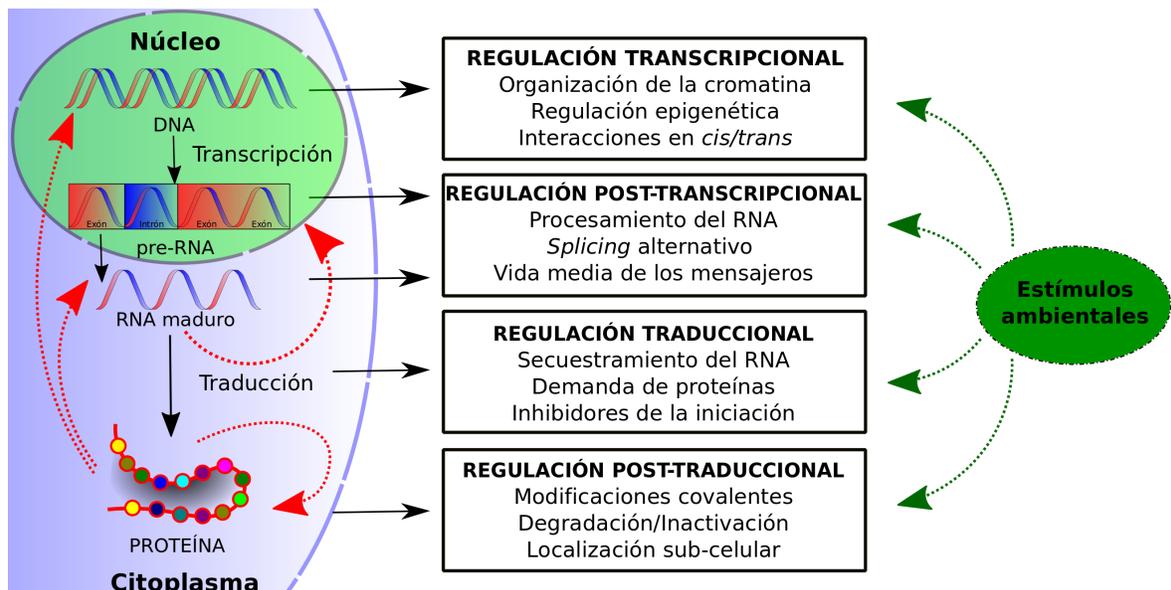


Figura 4. Niveles de regulación de la expresión génica. Cada nivel está controlado por diferentes mecanismos que afectan la transición entre cada etapa y los estímulos ambientales a los que una célula está sometida pueden afectar cada uno de estos mecanismos (flechas verdes). En respuesta a estos estímulos, tanto los RNAs como las proteínas pueden participar en la regulación de cada punto para modificar el perfil de expresión de la célula (flechas rojas).

Métodos avanzados para la detección de proteínas

Actualmente existen innumerables metodologías para la detección y el análisis de proteínas. Por décadas, la electroforesis en geles de poliacrilamida y técnicas de *blotting* conformaron el núcleo de las tecnologías para detección de proteínas. Tradicionalmente, estas tecnologías se han acoplado a diferentes técnicas de tinción, como la detección con plata o azul de Coomassie. Sin embargo, con el creciente desarrollo del campo de la proteómica y con la necesidad de contestar preguntas cada vez más complejas acerca del comportamiento de las proteínas, algunas limitaciones de estas técnicas se han vuelto evidentes, haciendo que disminuya la relación costo-beneficio. El análisis de proteínas en la actualidad requiere de técnicas cuantitativas de mayor sensibilidad, que sean fáciles de realizar y que además tengan el alcance de responder preguntas a escalas mucho mayores.

En este sentido, en los últimos años se han desarrollado diferentes técnicas basadas en la detección por fluorescencia o luminiscencia, las cuales ofrecen la oportunidad de marcar a las proteínas con una “etiqueta” o sonda que emite luz en una longitud de onda específica. Estas técnicas no sólo permiten reconocer de manera más certera a una proteína en particular, sino que resultan mucho más sensibles que los ensayos enzimáticos clásicos [Miller, Crawford y Gianazza, 2006]. Además, se han ubicado como las técnicas predilectas para detectar diferentes modificaciones post-traduccionales específicas, como fosforilaciones, acetilaciones, metilaciones, etc. Otra de las ventajas de utilizar estas sondas es que permiten analizar diferentes proteínas o versiones de una misma proteína a la vez, aumentando enormemente la cantidad de datos que se pueden coleccionar durante los experimentos.

Aunque actualmente los métodos de detección están basados casi por completo en la utilización de anticuerpos específicos, una de las estrategias alternativas para analizar los perfiles de expresión de genes de interés es su fusión al gen de una proteína fluorescente; esta aproximación permite no sólo medir los niveles relativos de proteína al cuantificar la intensidad media de fluorescencia en las muestras al igual que las técnicas basadas en anticuerpos, sino que también es una herramienta de gran utilidad para determinar la localización sub-celular de las proteínas, ya sea *in vivo* o en muestras fijadas, que en la mayoría de los casos resulta ser mucho más económica.

Si lo que se quiere es detectar únicamente los niveles de una proteína de interés en solución, por ejemplo, existen innumerables sistemas disponibles en el mercado que permiten detectar la cantidad de proteína mediante la utilización de diferentes reactivos que provocan que las sondas utilizadas emitan su fluorescencia. Sin embargo, si lo que nos interesa es **ver** a las proteínas dentro de la célula, ya sea para detectar variaciones en la expresión o bien para determinar su ubicación e incluso analizar su comportamiento en un organismo vivo, existen otras técnicas especializadas. Es importante mencionar que todas estas técnicas

se han desarrollado con la intención de contestar diferentes tipos de preguntas, por lo que a la hora de elegir cuál utilizar se deben tener muy claros los alcances y limitaciones de cada una.

¿Qué metodología elegir para detectar fluorescencia?

Cuando se habla de la detección de fluorescencia y como regla general, se deben considerar tres parámetros fundamentales: la velocidad de adquisición, la sensibilidad a la fluorescencia y el contenido de información. En los extremos funcionales de la detección encontramos a dos de las técnicas más utilizadas: la citometría de flujo y la microscopía de fluorescencia.

Cuando una muestra biológica se analiza mediante citometría de flujo, se requiere que se tengan células en suspensión y no adheridas a una superficie; además, la mayoría de los citómetros convencionales sacrifican por completo la formación de imágenes a favor de una tasa de adquisición sumamente rápida y una mayor sensibilidad a la fluorescencia. Cuando se realiza citometría de flujo, cada evento o célula se asocia con diferentes parámetros numéricos respectivos a la intensidad de fluorescencia y al grado de dispersión de la luz, ya sea de forma frontal o lateral: la dispersión frontal se relaciona con el tamaño de la célula, mientras que la dispersión lateral proporciona una aproximación de la granularidad (o complejidad) de la célula (figura 5); por otro lado, salvo que se trabaje con un tipo de sonda que tenga una localización sub-celular específica, la citometría por sí sola no ofrece ninguna información acerca de la localización de la fuente de fluorescencia dentro de la célula. La mayor bondad de esta técnica es sin duda la capacidad de analizar rápidamente muestras de gran tamaño (10,000 células por segundo, típicamente), lo que implica que incluso puedan detectarse subpoblaciones poco abundantes (por ejemplo, con una frecuencia de 1 en 10,000 células) en números estadísticamente significativos en un tiempo de detección corto [Basiji *et al.*, 2007].

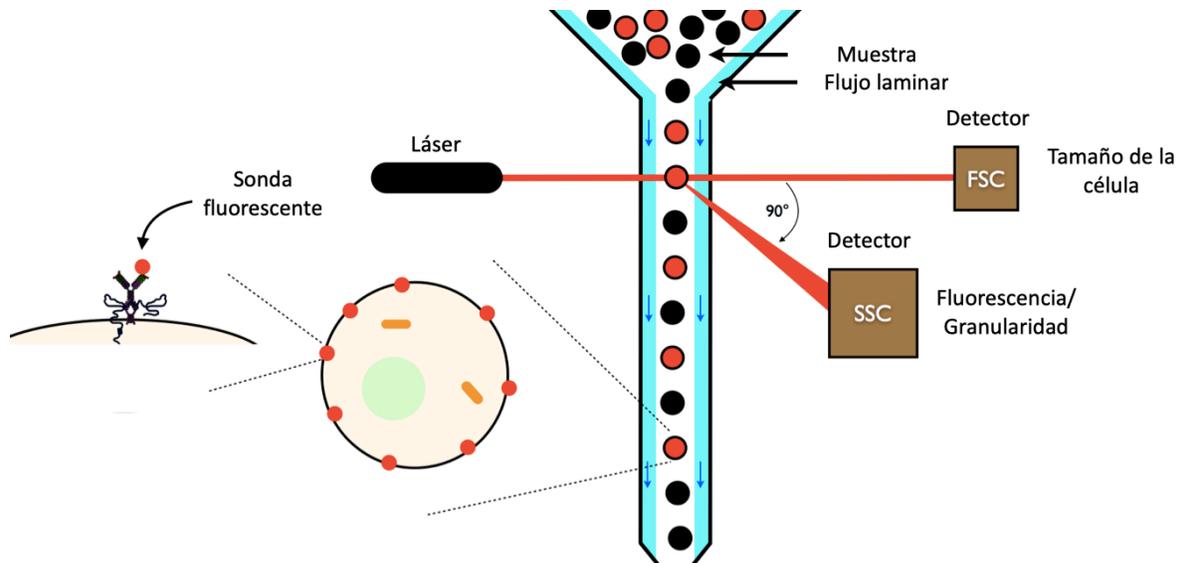


Figura 5. Esquema básico del funcionamiento de un citómetro de flujo. Las células en suspensión son enfocadas y ordenadas hidrodinámicamente mediante un flujo laminar; atraviesan un conducto transparente y un láser incide sobre ellas una a la vez. Alineado frente al láser, el detector FSC (por sus siglas en inglés, *forward scatter*) colecta la luz transmitida y dispersada por la muestra en un ángulo de entre 5° y 10°. A su vez, el detector SSC (por sus siglas en inglés, *side scatter*) colecta la luz que se desvía en un ángulo de 90°. En rojo se muestran células positivas para una sonda fluorescente (en este caso acoplada a un anticuerpo), y en negro las células negativas. Modificado de Sabban [2011].

Un microscopio confocal, en cambio, produce imágenes de alta resolución de células fluorescentes con las que se pueden generar proyecciones tridimensionales de una muestra con grosor al apilar diferentes fotografías de distintos planos focales de manera digital. Sin embargo, la formación de imágenes con tanto detalle y gran contenido de información puede tardar varios minutos. Además, la sensibilidad absoluta a la fluorescencia puede considerarse relativamente baja con respecto a otras técnicas, debido a que la forma en que se colecta la luz filtra toda la información que se encuentra fuera de foco, y porque la imagen se construye de forma serial a partir de mediciones individuales a lo largo de la preparación, reduciendo el tiempo disponible para colectar información de cada uno de estos puntos (figura 6). Aunque la sensibilidad se puede aumentar considerablemente incrementando los tiempos de exposición y recolección de información, se corre el peligro de blanquear las sondas que marcan a las proteínas en los planos que se encuentran fuera de foco, afectando la proyección tridimensional al terminar de formar la imagen. El diseño general de esta técnica la hace de gran utilidad para aplicaciones que requieren el análisis de características sub-celulares en muestras homogéneas, pero no en casos donde se requiere detectar sondas de baja intensidad o bien un número de células estadísticamente significativo en una muestra heterogénea [Basiji *et al.*, 2007].

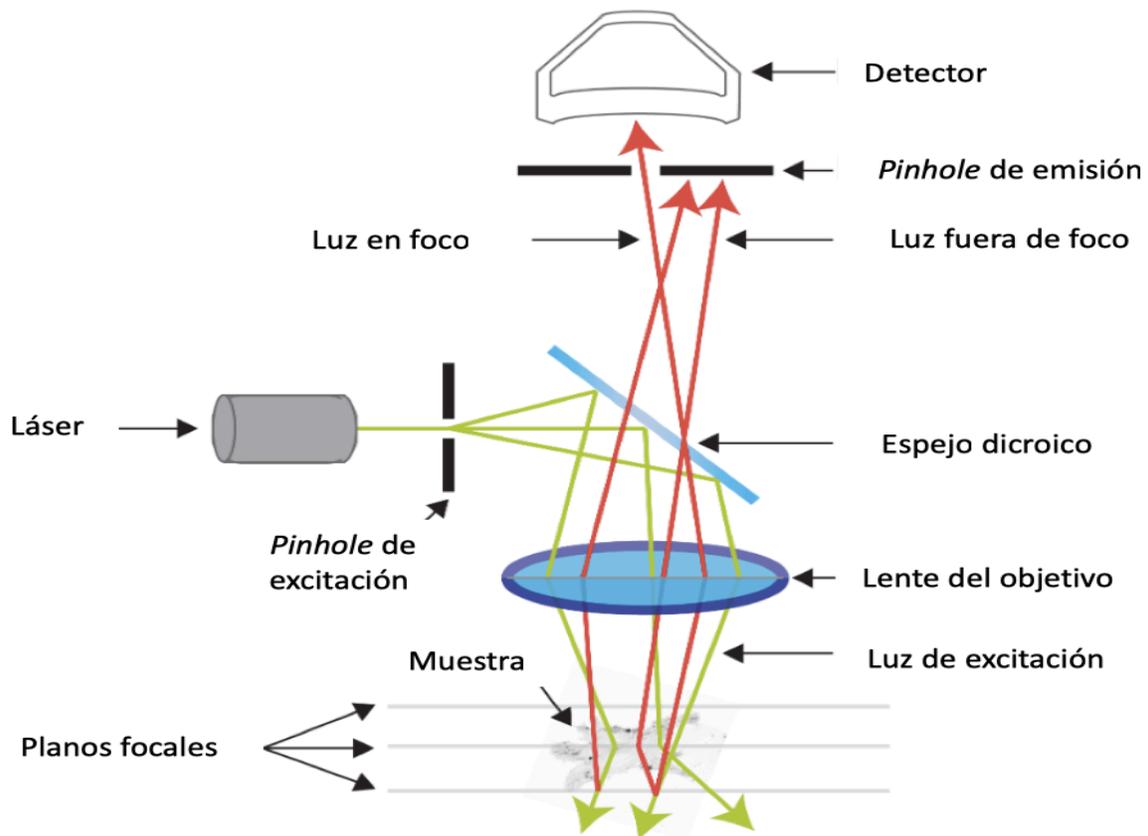


Figura 6. Esquema básico del funcionamiento de un microscopio confocal. La luz emitida por un láser (haz de excitación, en verde) es dirigida hacia la muestra mediante un sistema de lentes y espejos concentrada en un único punto. Tras la excitación, la luz emitida por la muestra (haces rojos) es redirigida hacia un sistema de detección que filtra todos los rayos que se encuentren fuera del foco del lente objetivo mediante un *pinhole* colocado frente al detector. El haz de excitación recorre la muestra un punto a la vez y la imagen se reconstruye de forma digital. Imagen disponible en el artículo “Confocal Microscopes” del sitio web de la Universidad de Queensland [Disponible en: <https://imb.uq.edu.au/facilities/microscopy/hardware-software/confocal-microscopes>].

En el mejor de los casos y si se tienen los medios necesarios, la combinación de estas dos técnicas permite identificar de manera certera un panorama amplio del comportamiento de alguna molécula de interés dentro de la célula.

JUSTIFICACIÓN

El desbalance en el procesamiento de las especies reactivas del oxígeno tiene efectos perjudiciales debido a su potencial de dañar prácticamente todas las estructuras celulares; es por ello que diferentes grupos de investigación se dedican al estudio de la actividad de proteínas antioxidantes y a las condiciones que alteran su funcionamiento.

Las catalasas son enzimas presentes en casi todos los organismos, procariontes o eucariontes, que están expuestos al oxígeno. Estas enzimas tienen la capacidad de dismutar el H_2O_2 , una especie reactiva del oxígeno, en H_2O y O_2 . La investigación en torno a las catalasas ha arrojado información relevante para entender procesos que van desde la apoptosis y la síntesis de biomoléculas, hasta el envejecimiento y el lapso de vida de los tejidos.

Debaryomyces hansenii es un organismo capaz de contender de forma muy eficiente contra los diferentes tipos de estrés presentes en su hábitat natural; es capaz de crecer en medios con hasta 25 % de NaCl y responder a cambios súbitos en la concentración de especies reactivas del oxígeno incrementando la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y las catalasas. Estas y otras características vuelven a esta levadura un organismo con un gran potencial biotecnológico.

Una de las estrategias que se han utilizado en los últimos años para analizar los perfiles de expresión de genes de interés es su fusión al gen de una proteína fluorescente. Esta aproximación permite no sólo medir los niveles relativos de proteína al cuantificar la intensidad de fluorescencia en las muestras, sino que también es una herramienta de gran utilidad para determinar la localización subcelular de las proteínas, ya sea *in vivo* o en muestras fijadas.

En este sentido, la propuesta de mi trabajo de tesis es fusionar los genes de cada catalasa de *D. hansenii* al gen de una proteína fluorescente (yECitrine) para poder cuantificar los niveles relativos de proteína como un parámetro directo de su expresión en la cepa acatalasémica y compararlos con la actividad específica de catalasa que se ha determinado en el laboratorio en diferentes condiciones de crecimiento.

OBJETIVO GENERAL

- Cuantificar los niveles relativos de las catalasas Cta y Ctt de *Debaryomyces hansenii*, expresadas heterológamente en una cepa acatalasémica de *Saccharomyces cerevisiae*, mediante su fusión a un reportero fluorescente en cuatro medios de cultivo.

Objetivos particulares

- Fusionar los genes *DhCTT* y *DhCTT* al gen de la proteína fluorescente yECitrine mediante PCR de sobrelape.
- Clonar ambos genes en el plásmido de expresión en *Saccharomyces cerevisiae* pRS316.
- Transformar una cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* con cada una de las construcciones y estudiar la dinámica de crecimiento en cuatro medios de cultivo diferentes.
- Analizar los niveles de actividad específica de catalasa de las levaduras transformadas con *DhCTA* y *DhCTT*, a partir extractos totales de proteína de células en la fase exponencial del crecimiento.
- Cuantificar *in vivo* los niveles relativos de proteína por intensidad media de fluorescencia en células en la fase exponencial del crecimiento mediante el uso de citometría de flujo y microscopía confocal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y medios de cultivo

Para analizar el comportamiento de las cepas transformantes *Sc acat* + pRS316::*DhCTA*, *Sc acat* + pRS316::*DhCTT*, *Sc acat* + pRS316::*DhCTA-yEC* y *Sc acat* + pRS316::*DhCTT-yEC*, se utilizaron como referencia una cepa de *Debaryomyces hansenii* en su forma silvestre (*Dh Wt*) y dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*: una en su forma silvestre y una mutante acatalasémica, obtenidas previamente en el laboratorio a través de la cruce de una cepa de *S. cerevisiae* con delección del gen *ScCTA1* (BY4742, Δ cta) y otra cepa con delección del gen *ScCTT1* (BY4741, Δ ctt), derivadas a su vez de la cepa S288c. Para descartar el factor de la carga genética del plásmido, las dos cepas de referencia de *S. cerevisiae* fueron transformadas con el plásmido pRS316 sin inserto. La descripción de las cepas utilizadas en este trabajo se encuentra resumida en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Cepas de referencia.

Cepa	Nomenclatura usada	Origen	Genotipo
<i>D. hansenii</i> Y7426	<i>Dh</i> WT	Laboratorio del Dr. Antonio Peña, Instituto de Fisiología Celular, UNAM	-
<i>S. cerevisiae</i> BY4743-4d <i>Sc</i> WT + pRS316	<i>Sc</i> WT	Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Facultad de Ciencias, UNAM	BY4741xBY4742 MAT ND his3 Δ 1 leu2 Δ 0 ura3 Δ 0
<i>S. cerevisiae</i> BY4743-4a <i>Sc acat</i> (Δ cta, Δ ctt) + pRS316	<i>Sc acat</i>	Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Facultad de Ciencias, UNAM	BY4741xBY4742 MAT ND his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 YDR256c::KanMX4 YGR088w::KanMX4

Tabla 2. Cepas experimentales.

Cepa	Nomenclatura usada
* <i>S. cerevisiae</i> BY4743-4a + pRS316:: <i>DhCTA</i>	<i>Sc acat</i> + pRS316:: <i>DhCTA</i>
* <i>S. cerevisiae</i> BY4743-4a + pRS316:: <i>DhCTT</i>	<i>Sc acat</i> + pRS316:: <i>DhCTT</i>
<i>S. cerevisiae</i> BY4743-4a + pRS316:: <i>DhCTA-yEC</i>	<i>Sc acat</i> + pRS316:: <i>DhCTA-yEC</i>
<i>S. cerevisiae</i> BY4743-4a + pRS316:: <i>DhCTT-yEC</i>	<i>Sc acat</i> + pRS316:: <i>DhCTT-yEC</i>

*Cepas previamente generadas en el laboratorio.

Todos los experimentos se iniciaron a partir de precultivos en medio rico YPD, que contiene extracto de levadura (Y), peptona de caseína (P) y glucosa (D) como fuente de carbono. Los medios usados en los experimentos diferían entre sí por la fuente de carbono adicionada (glucosa o etanol) y por la presencia o ausencia de NaCl. La composición de todos los medios se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Composición de ingredientes por litro para cada medio de cultivo de levaduras.

Reactivo	Marca	YPD	YPD + NaCl 0.6 M	YPE	YPE + NaCl 0.6 M
Extracto de levadura	Beckton Dickinson	10 g	10 g	10 g	10 g
Peptona de caseína	Beckton Dickinson	20 g	20 g	20 g	20 g
Glucosa	Sigma	20 g	20 g	-	-
*Etanol	Sigma	-	-	20 mL	20 mL
NaCl	Amresco	-	35 g	-	35 g
**Agar	Beckton Dickinson	20 g	20 g	20 g	20 g

*El etanol fue esterilizado por filtración a través de una malla de 0.22 μm y se añadió a los matraces correspondientes después de esterilizarlos en autoclave.

**Añadir sólo en caso de preparar medio sólido para cajas de Petri.

Para seleccionar y mantener a las cepas transformadas se usó medio mínimo sin uracilo adicionado con casaminoácidos para complementar las auxotrofías (ver tabla 1). La composición del medio se detalla en la tabla 4.

Tabla 4. Composición de ingredientes por litro del medio mínimo sin uracilo (*ura⁻*).

Reactivo	Marca	Cantidad
Yeast Nitrogen Base sin aminoácidos ni sulfato de amonio	Amresco	1.7 g
Glucosa	Sigma	10 g
Agar	Beckton Dickinson	20 g
Casaminoácidos	Amresco	6 g
Sulfato de amonio	Fermont	5 g

Mantenimiento de las cepas y condiciones de cultivo

Cada una de las cepas fue mantenida por separado en cajas Petri y se incubaron a 28 °C de 48 a 72 horas. Posteriormente, se almacenaron en refrigeración a 4 °C y se sembraron cada 30 días.

La cepa silvestre de *D. hansenii* fue sembrada en cajas con medio YPD-agar + NaCl 0.6 M, mientras que las cepas transformantes de *S. cerevisiae* se sembraron en medio mínimo de selección *ura⁻*.

Protocolo: Curvas de crecimiento

1. Inocular 50 mL de cultivo líquido YPD para *S. cerevisiae* o YPD + NaCl 0.6 M para *D. hansenii* a una densidad óptica de $A_{600\text{nm}} = 0.05$ con las cepas crecidas previamente en medio sólido.
2. Incubar los cultivos a 28 °C agitándose a 180 rpm durante al menos 24 horas en el caso de *S. cerevisiae* y 48 horas para *D. hansenii*.
3. Centrifugar los cultivos en tubos cónicos de polipropileno de 50 mL a 3,000 rpm durante 5 min.
4. Desechar el medio y lavar la pastilla de células con agua grado *Milli Q* usando un vórtex.
5. Volver a centrifugar a 3,000 rpm durante 5 min.
6. Desechar el agua y resuspender la pastilla en 1 mL de agua grado *Milli Q*.
7. Realizar diluciones seriales en microtubos de 1.5 mL hasta 1:1000 con la suspensión de levaduras.
8. Medir la absorbancia de la última dilución en el espectrofotómetro a 600nm, utilizando como blanco una celda de plástico PMMA UV con agua grado *Milli Q*.
9. Realizar el cálculo necesario para inocular con la suspensión de levaduras a una densidad óptica de $A_{600\text{nm}} = 0.05$ los cultivos con que se trabajará.
10. Tras inocular, tomar una alícuota de 1 mL y medir nuevamente la absorbancia a 600nm utilizando como blanco el medio en que se realizará la curva.
11. Colocar los matraces en la incubadora a 28 °C agitándose a 180 rpm.
12. Cada 3 horas, tomar alícuotas del cultivo para medir la densidad óptica $A_{600\text{nm}}$.

Nota: el rango de linealidad del espectrofotómetro (modelo DU 640, Beckman Coulter) se ubica entre una $A_{600\text{nm}} = 0.05$ y una $A_{600\text{nm}} = 0.5$. Cuando el cultivo alcance una densidad óptica mayor a este rango, realizar las diluciones necesarias.

Cálculo del tiempo de duplicación

El tiempo de duplicación fue calculado utilizando la herramienta virtual *Doubling-time calculator* (Roth, 2006) en la dirección electrónica <http://www.doubling-time.com/compute.php> con la opción *Several Time Points*. Se alimentaron los valores de tiempo de crecimiento en horas y $A_{600\text{nm}}$ de la fase de crecimiento exponencial.

Biología molecular

Protocolo: extracción de DNA genómico de *S. cerevisiae* o *D. hansenii*

1. Con una asada tomada de una caja con medio sólido, inocular 10 mL de medio rico (YPD para *S. cerevisiae* o YPD + NaCl 0.6 M para *D. hansenii*) e incubar a 28 °C y 180 rpm toda la noche.
2. Transferir el cultivo a un tubo de polipropileno de 50 mL estéril y centrifugar durante 5 min a 3,000 rpm.
3. Decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 10 mL de agua estéril.

4. Volver a centrifugar 5 min a 3,000 rpm.
5. Resuspender la pastilla en 2 mL de agua estéril y preparar cuatro alícuotas de 500 μ L en tubos de 1.5 mL.
6. Centrifugar 5 s a 14,000 rpm, decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla en el líquido residual.
7. Agregar 200 μ L de la solución de lisis (Tritón 2 %, SDS 1 %, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0), 200 μ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (PCI) 25:24:1 y un volumen de aproximadamente 300 μ L de microperlas de vidrio estériles. Agitar en vórtex continuamente durante 2 minutos.
8. Centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm, tomar la fase acuosa y transferirla a un tubo de 1.5 mL nuevo.
9. Agregar 300 μ L de PCI 24:25:1 y agitar en vórtex durante un minuto.
10. Centrifugar 2 min a 14,000 rpm y transferir la fase acuosa (superior) a un tubo limpio.
11. Añadir 300 μ l de cloroformo y agitar en vórtex durante un minuto.
12. Centrifugar 5 min a 14,000 rpm.
13. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
14. Agregar 1mL de etanol al 100% y mezclar por inversión.
15. Incubar 30 min a -20 °C.
16. Centrifugar 5 min a 14,000 rpm y eliminar el sobrenadante.
17. Añadir 1mL de etanol al 70 % frío, agitar en vórtex durante un minuto y volver a centrifugar.
18. Descartar el sobrenadante y centrifugar nuevamente a 14,000 rpm por 2 min para eliminar el exceso de etanol.
19. Dejar secar los tubos con la tapa abierta en un bloque térmico a 55 °C por ~20 min hasta que el etanol residual se evapore.
20. Resuspender en 30 μ L de agua estéril y cuantificar en un nanoespectrofotómetro (A_{260nm}/A_{280nm}).

Diseño, construcción y verificación de plásmidos

Oligonucleótidos

Para amplificar las secuencias utilizadas en este trabajo se diseñaron un total de cinco oligonucleótidos y se utilizaron dos más previamente diseñados en el laboratorio, cuyas características se muestran en la tabla 5.

Para el diseño de todas las construcciones se utilizó el software *Snapgene* (www.snapgene.com). El programa se alimentó con las secuencias, oligonucleótidos y plásmidos utilizados; además se simuló las amplificaciones, ligaciones e inserciones en el vector.

Para la clonación y propagación de todos los plásmidos y las construcciones se utilizó la cepa de *Escherichia coli* XL1Blue MRF' (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' proAB *lacI^q* Z Δ M15 Tn10 (Tet^r)]).

Tabla 5. Oligonucleótidos.

Nombre	Amplicón	Dirección	Secuencia 5' → 3'	Tm (SnapGene)
*CTABam	DhCTA- linker yEC	Forward	GCGCGC GGATCC ATTTTTACCACATGAGGCC BamHI	70 °C
CTAyEC		Reverse	CAGCACCGTCACCGAT CTTTCTTGGAGAAAGTTGTAAG linker	67 °C
*CTTBam	DhCTT- linker yEC	Forward	GCGCGC GGATCC GTTACTGCCACTGCATTGAG BamHI	63 °C
CTT-yEC		Reverse	CAGCACCGTCACCGAT GTTAGCAGGAGCTATTCCAAG linker	69 °C
yEClinker	Linker yEC	Forward	ATCGGTGACGGTGCTG	57 °C
ADH1Xhol		Reverse	CGAG CTCGAG CCGGTAGAGGTGTGGTC XhoI	64 °C
yECBam	yECitrine	Forward	GTCAG GGATCC ATGATCGGTGACGGTGCTG BamHI	58 °C

*Oligonucleótidos previamente diseñados y utilizados en el laboratorio.

El vector utilizado para las fusiones catalasa-proteína fluorescente fue el plásmido monocopia pRS316. Este plásmido complementa la auxotrofia por uracilo con el gen *URA3* y contiene el gen *BLA* que confiere resistencia a ampicilina como marcadores de selección; tiene además origen de replicación tanto para *E. coli* como para levadura (tabla 6).

El vector en donde se clonó el gen de yECitrine bajo el promotor *GAL1* es el plásmido multicopia pYES2. Contiene los mismos marcadores de selección que el plásmido pRS316 (complementación de auxotrofia a uracilo por el gen *URA3* y resistencia a ampicilina por el gen *BLA*) y orígenes de replicación para bacteria y levadura (tabla 6).

Tabla 6. Vectores.

Nombre	pRS316	pYES2	pKT175
Origen de replicación bacteriano	pMB1	pUC1	pMB1
Origen de replicación en levadura	CEN/ARS	2 micras	CEN/ARS
Marcador de selección en bacterias	Resistencia a ampicilina (β -lactamasa)	Resistencia a ampicilina (β -lactamasa)	Resistencia a ampicilina (β -lactamasa)
Marcador de selección en levaduras	Complementación por auxotrofia de uracilo (<i>URA3</i>)	Complementación por auxotrofia de uracilo (<i>URA3</i>)	Complementación por auxotrofia de uracilo (<i>URA3</i>)

Construcción de fusiones por PCR de solapamiento y clonación en plásmidos

El resumen de las características de cada una de las construcciones generadas en este trabajo se encuentra en la tabla 7.

DhCTA-yEC y DhCTT-yEC

Para todas las reacciones de PCR se utilizó la enzima de alta fidelidad *Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix* de *Thermo Scientific* y los programas utilizados se diseñaron siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Tabla 7. Construcciones.

Nombre	*pRS316:: <i>DhCTA</i>	*pRS316:: <i>DhCTT</i>	pRS316:: <i>DhCTA-yECitrine</i>	pRS316:: <i>DhCTT-yECitrine</i>	pYES2:: <i>yECitrine</i>
Vector	pRS316	pRS316	pRS316	pRS316	pYES2
Inserto	Gen de la catalasa A de <i>D. hansenii</i>	Gen de la catalasa T de <i>D. hansenii</i>	Catalasa A de <i>D. hansenii</i> fusionada a <i>yECitrine</i>	Catalasa T de <i>D. hansenii</i> fusionada a <i>yECitrine</i>	<i>yECitrine</i>
Promotor	Promotor nativo <i>DhCTA</i>	Promotor nativo <i>DhCTT</i>	Promotor nativo <i>DhCTA</i>	Promotor nativo <i>DhCTT</i>	<i>GAL1</i>
Terminador	Terminador nativo <i>DhCTA</i>	Terminador nativo <i>DhCTT</i>	<i>ADH1</i>	<i>ADH1</i>	<i>ADH1</i>

*Construcciones previamente generadas en el laboratorio

Los genes de ambas catalasas de *D. hansenii* se amplificaron directamente del DNA genómico utilizando un par de oligonucleótidos (CTABam/CTAyEC para *DhCTA*, y CTTBam/CTTyEC para *DhCTT*; tabla 5) que añadieran un sitio de corte *Bam*HI en el extremo 5' del amplicón y una secuencia de hibridación de 16pb en el extremo 3'.

Programa de amplificación de *DhCTA* y *DhCTT*

Desnaturalización inicial	98°C – 10 s	} 25 ciclos
Desnaturalización	98°C – 1 s	
Alineamiento	60°C – 5 s	
Extensión	72°C – 45 s	
Extensión final	72°C – 60 s	

A su vez, el gen de la proteína fluorescente *yECitrine* se amplificó desde el plásmido pKT175 con un par de oligonucleótidos (*yEClinker/ADH1Xho*; tabla 5) que añadieran la misma secuencia de hibridación de 16pb en el extremo 5' del ORF de *yECitrine* y un sitio de corte *Xho*I en el extremo 3', abarcando el terminador *ADH1* contenido en el plásmido.

Programa de amplificación de *linker-yEC* y *yECitrine*

Desnaturalización inicial	98°C – 10 s	} 25 ciclos
Desnaturalización	98°C – 1 s	
Alineamiento	60°C – 5 s	
Extensión	72°C – 15 s	
Extensión final	72°C – 60 s	

La fusión de ambos amplicones se realizó mediante una reacción de PCR de solapamiento, que consiste en dos fases:

En la primera fase, la reacción contiene los amplicones a fusionar en ausencia de oligonucleótidos y se utiliza una temperatura de alineamiento que favorezca la complementación de la región de hibridación previamente sintetizada. El tiempo de extensión debe permitir la síntesis del amplicón más largo; cada uno de los amplicones funge entonces como un mega-oligonucleótido a partir del cual la polimerasa sintetiza la secuencia fusionada.

En la segunda fase, se añaden a la reacción dos oligonucleótidos: el oligonucleótido sentido utilizado para amplificar el gen de cada catalasa (CTABam o CTTBam; tabla 5) y el oligonucleótido antisentido utilizado para amplificar el gen de yECitrine con el terminador *ADH1* (ADH1Xho; tabla 5). Esta vez la temperatura de alineamiento debe favorecer el alineamiento de ambos oligonucleótidos y el tiempo de extensión debe permitir la síntesis de la secuencia fusionada en su totalidad.

Programa de PCR de solapamiento para la fusión de los insertos catalasa-yECitrine

Desnaturalización inicial	98°C – 30 s		Desnaturalización inicial	98°C – 10s	
Desnaturalización	98°C – 1 s	} 15 ciclos	Desnaturalización	98°C – 1s	} 15 ciclos
Alineamiento	66°C – 5s		Alineamiento y extensión	72°C – 57s	
Extensión	72°C – 42s		Extensión final	72°C – 60s	

yECitrine

El gen de yECitrine se amplificó a partir del plásmido pKT175 con un oligonucleótido sentido (yECBam; tabla 5) que abarca los 16 pares de bases de la región de hibridación contenida en el plásmido y un sitio de corte para la enzima de restricción *BamHI*. El oligonucleótido antisentido (ADH1Xho; tabla 5) hibrida con el extremo 3' del terminador *ADH1*, contenido también en el plásmido y añade un sitio de corte *XhoI*. Esta secuencia fue clonada en el plásmido pYES2 bajo el promotor *GAL1* contenido en el plásmido. Esta construcción se diseñó para transformar una cepa de *S. cerevisiae* que sirviera como control positivo de la detección de fluorescencia al crecerla en un medio con galactosa como fuente de carbono.

Purificación de productos de PCR

Los productos de cada reacción de PCR fueron purificados mediante una columna o bien por recuperación a partir de una banda de agarosa en el caso de las fusiones catalasa-yECitrine, utilizando el kit de Qiagen *QIAquick PCR purification kit* y el kit de Zymo Research *Zymoclean gel DNA recovery kit*, respectivamente. Los productos purificados fueron cuantificados posteriormente en un nanoespectrofotómetro.

Digestión de productos de PCR y vectores

Se llevaron a cabo reacciones de 20 μL con 500 ng de inserto o vector, utilizando las enzimas *BamHI* y *XhoI* (*Thermo Scientific*) en todos los casos. Se incubaron a 37 °C durante 3 horas y posteriormente se inactivaron las enzimas con un choque térmico de 80 °C durante 20 minutos. Todos los productos de las digestiones fueron purificados por columna con el kit *QIAquick PCR purification kit*.

Ligación de vector e insertos

Las reacciones de ligación se realizaron utilizando aproximadamente 120 ng de vector previamente digerido y purificado. La relación molar vector-inserto fue de 1:1 en el caso de las fusiones catalasa-yECitrine debido a que el tamaño de los insertos y el plásmido pRS316 era muy similar. En el caso del inserto yECitrine, la relación molar vector-inserto fue de 1:3, pues el inserto era mucho más pequeño que el plásmido pYES2.

Todas las reacciones se realizaron con el kit de *Thermo Scientific Rapid DNA Ligation kit*. El tiempo de incubación fue de 10 minutos a temperatura ambiente.

Transformación en *E. coli XL1Blue*

De cada reacción de ligación se tomaron 5 μL para transformar células competentes de calcio de la cepa de *E. coli XL1Blue* mediante incubación en hielo por 15 min y un choque térmico de 90 seg a 42 °C. Las células se recuperaron durante 45 minutos en 1 mL de medio líquido LB sin ampicilina (tabla 8), se centrifugaron 1 min a 4,000 rpm y se resuspendieron en 100 μL de LB fresco para sembrar en placas con medio de selección LB-agar-ampicilina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con perlas de vidrio estériles. Las cajas se incubaron durante 2 días a 30 °C.

Tabla 8. Composición de ingredientes por litro del medio LB para cultivo de bacterias.

Reactivo	Marca	Cantidad
Peptona de caseína	Beckton Dickinson	10 g
Extracto de levadura	Beckton Dickinson	5 g
NaCl	Amresco	10 g
*Agar	Beckton Dickinson	5 g
**Ampicilina	Amresco	200 mg

*Añadir sólo en caso de preparar medio sólido para cajas de Petri.

**Añadir después de esterilizar el medio de cultivo y esperar a que alcance una temperatura menor a 60 °C para evitar que el antibiótico se degrade.

Selección de transformantes y verificación de plásmidos con inserto mediante digestión enzimática

Tras el periodo de incubación, se seleccionaron cinco colonias transformantes de cada placa para determinar que realmente hubieran incorporado el inserto correspondiente mediante una doble digestión del DNA plasmídico.

Las colonias seleccionadas se crecieron durante una noche en medio LB líquido con ampicilina a 30 °C y 250 rpm y posteriormente se realizó una extracción de DNA plasmídico con el siguiente protocolo.

Protocolo: obtención de DNA plasmídico en pequeña escala (miniprep)

1. Inocular 4 mL de medio LB-ampicilina (200 mg/mL) con una colonia de *E. coli* transformada con el plásmido de interés e incubar toda la noche a 37 °C con agitación a 250 rpm.
2. Transferir el volumen a un microtubo estéril y centrifugar las veces que sean necesarias a 3000 rpm por 3 minutos para recuperar las células.
3. Resuspender la pastilla de células en 100 µL de solución SET (Sacarosa 25 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8.0) fría.
4. Añadir 200 µL de amortiguador de lisis (NaOH 0.2 M, SDS 1 %) y mezclar suavemente por inversión hasta que la solución sea translúcida.
5. Añadir 150 µL de solución de neutralización (CH₃COOK 5 M pH 4.8) y mezclar suavemente por inversión hasta observar un precipitado blanco.
6. Reposar 10 min en hielo.
7. Centrifugar 5 min a 14,000 rpm, transferir sobrenadante por decantación a un tubo nuevo y etiquetado.
8. Añadir 250 µL de isopropanol y agitar 10 veces por inversión. Incubar 1 min a temperatura ambiente.
9. Centrifugar 3 min a 14,000 rpm y desechar el sobrenadante con ayuda de una micropipeta sin tocar la pastilla.
10. Centrifugar 1 min a 14,000 rpm para eliminar el exceso de isopropanol.
11. Eliminar el sobrenadante con ayuda de una micropipeta sin tocar la pastilla.
12. Añadir 500 µL de etanol al 70 % frío y agitar con vórtex.
13. Centrifugar 5 min a 14,000 rpm y descartar el sobrenadante sin tocar la pastilla.
14. Secar al aire entre 10 y 20 minutos con la tapa abierta o en un baño seco a 55 °C.
15. Resuspender en 50 o 100 µL de agua estéril.
16. Agregar 1 µL de RNAsa (Sigma) e incubar 30 min a 37 °C.
17. Cuantificar en un nanoespectrofotómetro.

Una vez obtenido, ~100ng del DNA plasmídico fueron digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I en reacciones de 20µL para analizar el patrón de restricción mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Los geles se prepararon al 1% de agarosa con amortiguador TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1mM) 1x. Para preparar el gel se tomaron 50mL de TAE 1x y 0.5 g de agarosa. Esta mezcla se calentó hasta fundir la agarosa y después de unos minutos de enfriamiento se colocó en la charola (10 x 15 cm) con un peine para formar los pozos. Se cargaron las muestras con amortiguador de carga para DNA 6x (30 % glicerol, 0.25 % azul de bromofenol). Los geles se corrieron a un voltaje de 100 V durante una hora, posteriormente se tiñeron en una solución de *GelRed 3x (Biotium)* y se observaron en un transiluminador UV dentro de un cuarto oscuro. El registro fotográfico se realizó con una cámara *Canon PowerShot A650*.

Tras verificar el patrón de restricción, los plásmidos que contenían el inserto correspondiente fueron transformados nuevamente en células competentes de *E. coli* para amplificarlos y purificarlos utilizando el kit *Gene Elute Plasmid Miniprep Kit (Sigma)* siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, los plásmidos fueron cuantificados en un nanoespectrofotómetro.

Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

1. Inocular 5 mL de YPD con la cepa a transformar e incubar 12 hrs a 28 °C y 180 rpm.
2. Al día siguiente, precalentar en incubadora un matraz con 30 mL de YPD.
3. Inocular con 1 mL del precultivo y medir absorbancia a 600nm (debe estar aproximadamente en una D.O.= 0.2).
4. Incubar a 28 °C y 180 rpm hasta que el cultivo alcance una absorbancia de ~0.4 – 0.6.
5. Centrifugar 5 min a 3000 rpm y desechar el sobrenadante
6. Resuspender la pastilla en 1 mL de H₂O estéril agitando con vórtex.
7. Transferir a un tubo estéril de 1.5 mL.
8. Centrifugar 5 min a 3000 rpm y eliminar el sobrenadante.
9. Resuspender en 1 mL de TEL (TE 1x, 1 % acetato de litio y H₂O estéril).
10. Centrifugar 5 s a velocidad máxima y eliminar el sobrenadante y resuspender en 200 µL de TEL.
11. Dividir el concentrado en 4 tubos estériles de 0.6 mL, colocando 50 µL en cada uno.
12. Agregar a cada tubo 5 µL de DNA de esperma de salmón (10 µg/µL) (previamente hervido 95 °C durante 5 min y colocado en hielo 5 min).
13. Agregar a cada tubo aproximadamente 500 ng del plásmido transformante. Como control, no agregar plásmido a uno de los tubos.
14. Agregar 300 µL de TELP (TE 1X, 1 % acetato de litio, 40 % PEG) a cada tubo y agitar en vórtex.
15. Incubar 30 min a 30 °C (a la mitad el tiempo, mezclar 3 veces por inversión).
16. Agregar 40 µL de dimetil-sulfóxido (DMSO) y agitar en vórtex.
17. Incubar a 42 °C por 15 min.
18. Incubar en hielo 2 min.
19. Centrifugar al menos 5 s a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante
20. Resuspender cada pastilla en 100 µL de H₂O estéril.

21. Sembrar en cajas con medio de selección correspondiente para cada plásmido con perlas de vidrio estériles.
22. Incubar a 28 °C al menos por 48 hrs.

Prueba rápida de actividad de catalasa

El ensayo consiste en tomar varias colonias aisladas directamente de la caja de Petri y colocarlas en una placa de 96 pozos a los que previamente se agregó peróxido de hidrógeno al 3%. Si las células comienzan a producir burbujas (resultado de la actividad de catalasa, que dismuta el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno) se considera como un resultado positivo; en caso contrario, la prueba es considerada como negativa (figura 7).

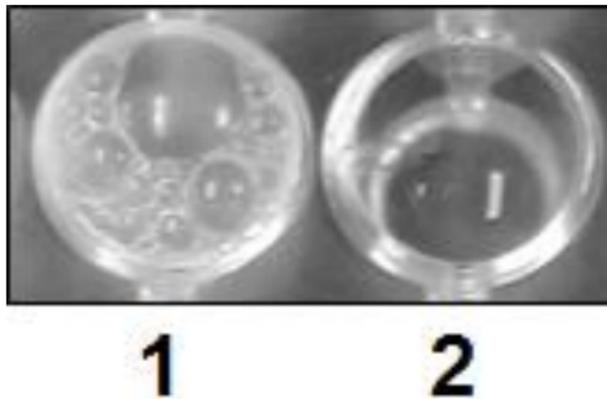


Figura 7. Prueba rápida de actividad de catalasa, mostrando un resultado positivo (1) y un resultado negativo (2).

Determinación de actividad específica de catalasa

Obtención de extracto crudo de proteína

1. A partir de un cultivo de levaduras de 100mL, coleccionar las células cuando alcancen la densidad óptica A_{600nm} deseada (entre 1 y 2 para fase exponencial) en tubos cónicos de polipropileno de 50 mL y centrifugar 5 minutos a 3,000 rpm; repetir en caso de ser necesario para coleccionar todas las células del cultivo.
2. Añadir aproximadamente 25 mL de agua grado *Milli Q* estéril y agitar las células en vórtex para lavar los restos de medio.
3. Centrifugar nuevamente por 5 min a 3,000 rpm. Repetir hasta completar 3 lavados.
4. Colocar un tubo de ensayo de vidrio en hielo por cada experimento.
5. Resuspender la pastilla de células en 1 mL de amortiguador de lisis (glicerol 20%, amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M, pH 7.4).
6. Colocar la suspensión de células en los tubos de ensayo previamente enfriados y añadir perlas de vidrio de 710 – 1,180 μm de diámetro estériles hasta que ocupen la mitad del volumen dentro del tubo.
7. Agitar cada tubo en vórtex vigorosamente durante 1 min y dejar reposar en hielo 1 min más; repetir de 3 a 5 veces por cada muestra.

8. Transferir a microtubos estériles de 1.5 mL con ayuda de una pipeta Pasteur con cuidado de no tomar las perlas de vidrio.
9. Centrifugar el extracto durante 15 min a 14,000 rpm a 4 °C para deshacerse de los restos celulares.
10. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y centrifugar nuevamente.
11. Recuperar la muestra en microtubos nuevos y etiquetados.

Protocolo: Cuantificación de proteína en extractos crudos por el método de Bradford

Curva patrón

1. En tubos de ensayo con 1mL de reactivo de Bradford 1x (Sigma) añadir 20 μ L de ocho diluciones seriales de albúmina sérica bovina (BSA) con concentraciones desde 0.05 mg/mL hasta 0.75 mg/mL y agitar.
2. Incubar 5 min a temperatura ambiente y leer 1 mL de cada muestra en el espectrofotómetro a 590nm.

Muestras problema

1. En tubos de ensayo con 1 mL de reactivo de Bradford agregar 20 μ L de la muestra de interés.
2. Agitar levemente para mezclar homogéneamente.
3. Incubar 5 min a temperatura ambiente y leer 1 mL de cada muestra en el espectrofotómetro a 590 nm.

Nota: Si la concentración del extracto es demasiado alta (más que la dilución estándar de 0.75 mg/mL), realizar las diluciones necesarias para que la medida de su absorbancia se ubique dentro de la curva patrón.

Protocolo: Ensayo de la actividad específica de catalasa

1. Preparar una solución fresca de H₂O₂ a una concentración de 500 mM en agua grado *Milli Q*.
2. En una celda de cuarzo añadir 2.9 mL de amortiguador de actividad de catalasa (fosfatos de potasio 0.1 M, tritón 0.01 %, pH 7.4) y un volumen de entre 5 y 20 μ L de extracto proteico.
3. Agregar 100 μ L de la solución de H₂O₂ 500 mM, mezclar el contenido de la celda por inversión e iniciar la medición de la absorbancia a 240nm.
4. Seguir el decaimiento del H₂O₂ durante 3 minutos y calcular la pendiente por minuto, *m*.
5. Repetir el procedimiento al menos 3 veces por cada muestra.
6. Calcular la actividad específica usando la fórmula 1.

Fórmula 1:

$$AEC = \frac{\left(\frac{m}{\epsilon}\right) * (\text{Volumen de reacción en } \mu\text{L})}{\text{mg de proteína añadidos}}$$

En donde:

AEC = Actividad específica de catalasa ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ oxidado/min/mg de proteína)

m = Pendiente por minuto del decaimiento de H_2O_2 en la reacción

ϵ = Coeficiente de extinción molar del $\text{H}_2\text{O}_2 = 43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

V reacción = 3000 μL

Detección de proteínas mediante métodos fluorométricos

Citometría de flujo

Para analizar las muestras en el citómetro de flujo, se tomó una alícuota de 1 mL de un cultivo a una D.O. $A_{600\text{nm}} \sim 1-2$. Tras calibrar el voltaje de los fotomultiplicadores y determinar los eventos considerados como células individuales para la adquisición de datos, se realizó una dilución 1:10 de cada muestra en la solución Focusing Fluid 1X (Applied Biosystems, No. 4449790) y se registraron 50,000 eventos. El análisis se realizó en un citómetro de flujo Attune Acoustic Focusing Cytometer de Applied Biosystems, utilizando un láser de excitación de 488 nm para detectar la intensidad de fluorescencia a una emisión de 520 nm. El análisis de los datos obtenidos se realizó en el software FlowJo (LLC) y se utilizó la media geométrica como parámetro estadístico de la intensidad media de fluorescencia de cada muestra. Estos ensayos se llevaron a cabo en la División de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, a cargo de la Dra. Laura Ongay-Larios.

Preparación de muestras para microscopía confocal (células vivas)

Tratamiento del cubreobjetos

1. Añadir 30-50 μL de concanavalina A preparada en agua grado *Milli Q* [0.1 mg/mL] a un cubreobjetos previamente lavado con etanol y distribuir por toda la superficie. Dejar secar completamente.
2. Sumergir de dos a tres veces el cubreobjetos en un recipiente con agua grado *Milli Q*. Esto removerá el excedente de concanavalina A que no se adhiera a la superficie del mismo.

Preparación de las células

1. Crecer un cultivo hasta la densidad óptica deseada.
2. Transferir todo el cultivo a tubos de polipropileno de 50 mL y centrifugar 5 min a 3,000 rpm para desechar el medio.

3. Añadir aproximadamente 25 mL de agua grado *Milli Q* estéril y centrifugar 5 min a 3,000 rpm. Repetir el proceso hasta completar 3 lavados
4. Resuspender las células en ~3 mL de agua grado *Milli Q* (para un cultivo crecido hasta una densidad óptica $A_{600\text{nm}}$ de ~1-2).

Montaje

1. Añadir de 30-50 μ L de la suspensión de células sobre la superficie tratada del cubreobjetos y esparcir con la punta de la micropipeta hasta que se seque por completo.
2. Sumergir el cubreobjetos en un recipiente con amortiguador PBS 1X para remover las células que no se hayan adherido.
3. Colocar el cubreobjetos con las células adheridas en una caja de Petri de 35 mm que contenga agua grado *Milli Q* y observar al microscopio con un objetivo de inmersión en agua.

Las células fueron observadas en un microscopio confocal modelo TSP-8 (Leica *Microsystems*) con un objetivo 63x de inmersión en agua (HC APO UVIS CS2).. Se utilizó el láser OP SL al 4 % de intensidad con una longitud de onda de excitación a 488 nm; la luz de emisión fue colectada a 520 nm. Estos experimentos se realizaron en la Unidad de Microscopía de la Facultad de Ciencias, a cargo de la Dra. Tatiana Fiordelisio-Coll.

El análisis de las imágenes se llevó a cabo utilizando la herramienta *ROI manager* del software Image J [Schindelin *et al.*, 2012]. Con esta herramienta se delimitan de forma manual todas las células individuales dentro de cada fotografía para cuantificar la intensidad de fluorescencia. A su vez, el manejo de los datos se realizó utilizando el software de análisis estadístico R (<http://www.R-project.org/>)

RESULTADOS

Diseño, construcción y verificación de plásmidos

Con el objetivo de etiquetar a las proteínas codificadas por *DhCTA* y *DhCTT*, cada gen se fusionó a la secuencia codificante de la proteína fluorescente yECitrine, una variante de la proteína amarillo fluorescente (YFP; *yellow fluorescent protein*) obtenida del plásmido pKT175. Esta variante fue optimizada para el uso preferencial de codones en levaduras y la intensidad de fluorescencia que emite es al menos dos veces mayor que la YFP convencional, lo que permite detectar a la proteína aún si es expresada en niveles bajos [Sheff y Thorn, 2004]. Esta proteína ha sido utilizada previamente como reportero de expresión en *S. cerevisiae* y permite el correcto plegamiento de los dos marcos de lectura fusionados [López, 2015].

Se construyeron tres plásmidos: dos con los genes de las catalasas A y T de *D. hansenii* (*DhCTA* y *DhCTT*, respectivamente) fusionados al gen de la proteína fluorescente yECitrine, y uno más que sólo contenía el marco de lectura de yECitrine con el terminador *ADH1*. El vector utilizado para clonar las fusiones catalasa-proteína fluorescente fue el plásmido monocopia pRS316, que ya ha sido utilizado para expresar a *DhCTA* [Noriega, 2012] y *DhCTT* [Castillo-Díaz, 2013] en *S. cerevisiae*. En el vector multicopia pYES2 se clonó el gen de yECitrine-*ADH1* bajo el promotor *GAL1*. Ambos plásmidos contienen el gen *URA3* como marcador de selección en levaduras, el cual complementa la auxotrofia por uracilo; poseen además el gen *BLA* como marcador de selección en bacterias, que confiere a las células resistencia a la ampicilina.

Las características de cada plásmido están resumidas en la tabla 7.

Construcción de insertos

Fusiones catalasa-yECitrine

Los genes *DhCTA* y *DhCTT* fueron amplificados directamente del DNA genómico de *D. hansenii* siguiendo la misma estrategia en ambos casos. El oligonucleótido sentido hibrida 1000 pares de bases río arriba del marco de lectura para amplificar el promotor nativo de cada gen, añadiendo un sitio de corte *Bam*HI en el extremo 5'; el oligonucleótido sentido, a su vez, fue diseñado para añadir una secuencia de hibridación de 16pb en lugar del codón de término en el extremo 3'; esta secuencia también es la región de hibridación entre los dos marcos de lectura que se fusionaron mediante PCR de solapamiento (figura 8, A).

Por otro lado, el gen de yECitrine se amplificó a partir del plásmido pKT175; el oligonucleótido sentido hibrida 16 pb de la región de hibridación que se encuentra río arriba del marco de lectura de yECitrine, y el oligonucleótido antisentido hibrida en el terminador *ADH1*, río abajo del marco de lectura de yECitrine, y añade un

sitio de corte *Xho*I en extremo 3' (figura 8, B). Una vez obtenidos, ambos amplicones se fusionaron mediante una reacción de PCR de sobrelape (figura 8, C).

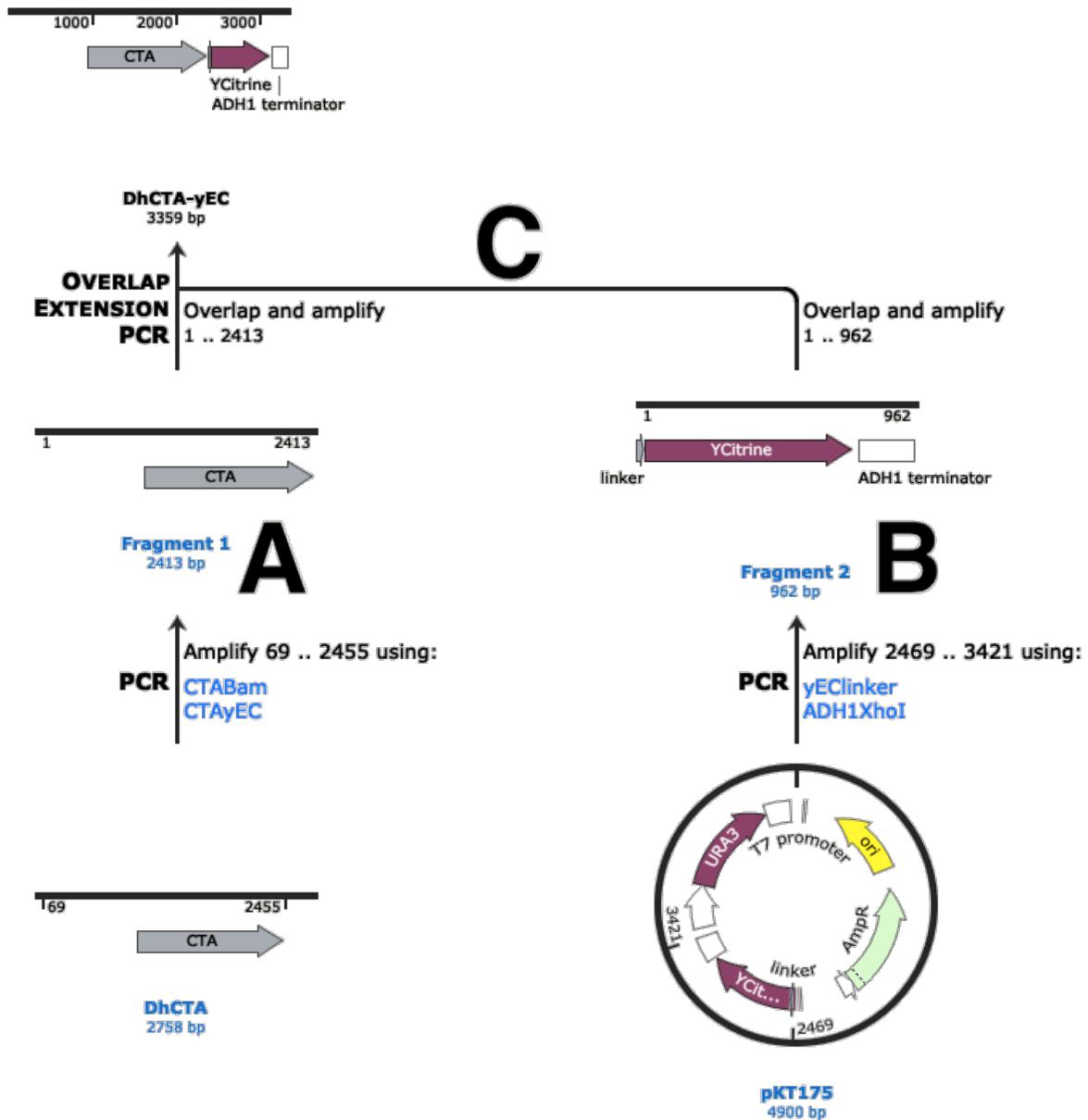


Figura 8. Resumen gráfico de la construcción de los insertos catalasa-yECitrine mediante PCR de sobrelape, elaborado con el software *SnapGene*. En este caso se muestra la construcción *DhCTA-yECitrine*. A) Síntesis del amplicón *DhCTA* a partir del DNA genómico de *D. hansenii*. B) Síntesis del amplicón yECitrine-ADH1 a partir del plásmido pKT175. C) Fusión de los dos amplicones mediante PCR de sobrelape.

yECitrine: control positivo para la detección de fluorescencia

Para generar una construcción que sirviera como control positivo de la detección de fluorescencia, el gen de yECitrine se clonó en el plásmido pYES2 bajo el promotor *GAL1* para poder inducir su expresión en un medio con galactosa como fuente de carbono. La secuencia codificante de yECitrine se amplificó a partir del plásmido pKT175 (figura 9, A). El oligonucleótido sentido hibrida en el extremo 5' del marco de lectura, pero en lugar de añadir las 16pb de la región de hibridación, añade un sitio de corte *Bam*HI río arriba del codón de inicio para poder clonar el inserto bajo el promotor *GAL1* en el plásmido pYES2 mediante digestión enzimática (figura 9, B). El oligonucleótido antisentido es el mismo utilizado para la amplificación *linker-yEC*.

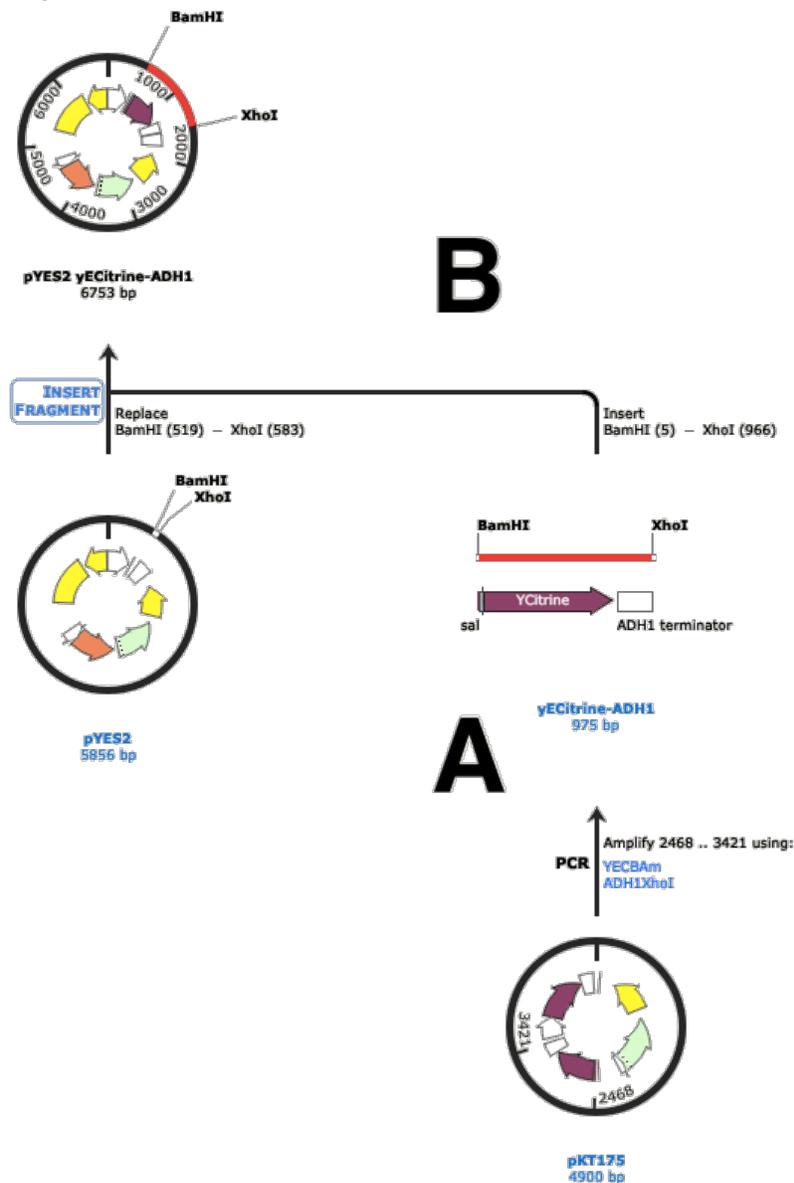


Figura 9. Estrategia de clonación de yECitrine bajo el promotor GAL1. A) Amplificación del marco abierto de lectura de yECitrine a partir del plásmido pKT175. B) Digestión enzimática y ligación del inserto yECitrine dentro del plásmido pYES2.

En una primera etapa se amplificaron los marcos abiertos de lectura individuales y el tamaño de cada uno de los amplicones sintetizados por PCR fue verificado mediante una electroforesis en gel de agarosa (figura 10, A). En la segunda etapa se fusionaron los marcos abiertos de lectura de cada catalasa con el del reportero yECitrine mediante PCR de sobrelape; el tamaño esperado para las fusiones era de ~3300pb para la fusión *DhCTA*-yEC y ~3800pb para *DhCTT*-yEC (figura 10, B). Debido a que la eficiencia de las reacciones de sobrelape no fue del 100% y para garantizar la clonación de las fusiones completas, se cortaron y purificaron de banda únicamente los amplicones correspondientes a la fusión catalasa yECitrine (figura 10, flechas en B).

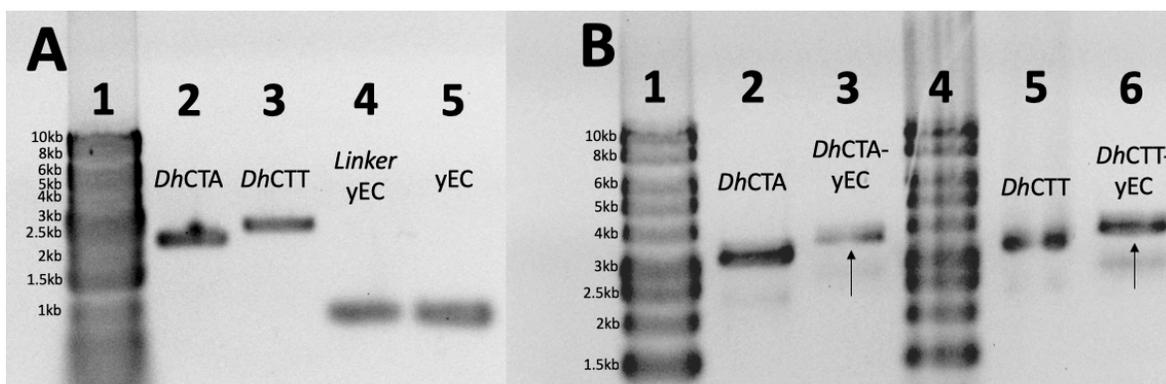


Figura 10. Electroforesis en geles de agarosa de los productos de PCR.

Panel A. Carril 1: marcador de peso molecular 1 kb (Axygen); carriles 2 y 3: amplicones correspondientes a *DhCTA* (~2400pb) y *DhCTT* (~2900pb) con promotor nativo y la región *linker*; carril 4: amplicón *linker*-yECitrine (~900pb); marco de lectura de yECitrine con sitios *Bam*HI y *Xho*I (~900pb).

Panel B. Carril 1: marcador de peso molecular 1kb (Axygen); carril 2: amplicón *DhCTA* con la región *linker*; carril 3: amplicón *DhCTA*-yECitrine obtenido por PCR de sobrelape (~3300pb); carril 4: marcador de peso molecular 1kb (Axygen); carril 5: amplicón *DhCTT* con la región *linker*; carril 6: amplicón *DhCTT*-yECitrine obtenido por PCR de sobrelape (~3800pb). Las flechas indican el amplicón correspondiente a la fusión catalasa-yECitrine en ambos casos.

Digestión enzimática y clonación en vectores de expresión

Tras verificar el tamaño de cada uno de los amplicones purificados, tanto los insertos como los vectores fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I. Posteriormente, los productos digeridos se ligaron a temperatura ambiente y se transformaron en células competentes de *Escherichia coli* XL1Blue.

El resumen gráfico del proceso de clonación por digestión enzimática de las tres construcciones se muestra en la figura 11.

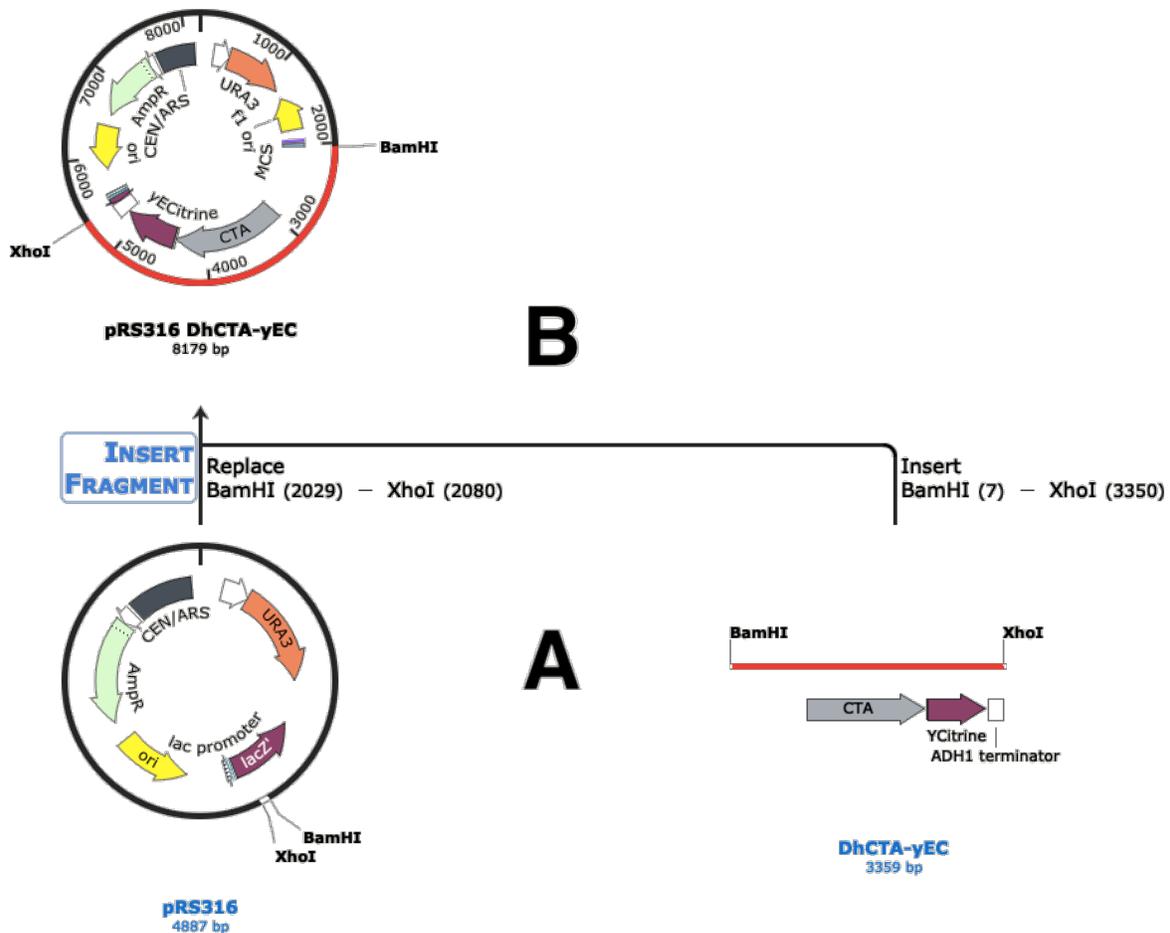


Figura 11. Resumen gráfico del proceso de clonación por digestión enzimática. En este caso se muestra únicamente la construcción pRS316::*DhCTA-yECitrine*. A) Doble digestión del inserto y el vector con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I. B) Ligación del plásmido y el inserto.

Selección de clonas positivas mediante digestión enzimática

Después de transformar a las células de *E. coli* e incubarlas en medio de selección con ampicilina, se eligieron 5 colonias al azar para crecerlas en medio líquido y extraer el DNA plasmídico. Para analizar que se hubiera clonado el inserto correspondiente de forma correcta, se realizaron digestiones enzimáticas con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I.

En el caso de las clonas transformadas con el plásmido pRS316::*DhCTA-yEC* se esperaba que la doble digestión arrojara una banda de ~3300 pb correspondiente al inserto y otra de 4800 pb correspondiente al plásmido (figura 12, A). Si la doble digestión generó sólo una banda de DNA (correspondiente sólo al plásmido linearizado), se consideró a esa colonia como un falso positivo. Esto es cierto también para las clonas del plásmido pRS316::*DhCTT-yEC*, con la diferencia de que el inserto liberado sería de ~3800 pb (figura 12, B).

En la figura 12 se muestra el resultado obtenido tras realizar la electroforesis de los plásmidos sin digerir y digeridos con las enzimas de restricción. En ambos casos, el recuadro azul resalta una clona positiva para el inserto correspondiente. La eficiencia de la ligación fue bastante baja, pues se obtuvo una proporción de clonas positivas/falsos positivos de aproximadamente 1:10 para las construcciones catalasa-proteína fluorescente; sin embargo, se logró aislar de una a tres clonas positivas para cada construcción. No se muestran los datos de la digestión del plásmido pYES2::yECitrine; con esta construcción se realizaron las mismas pruebas para aislar tres clonas positivas.

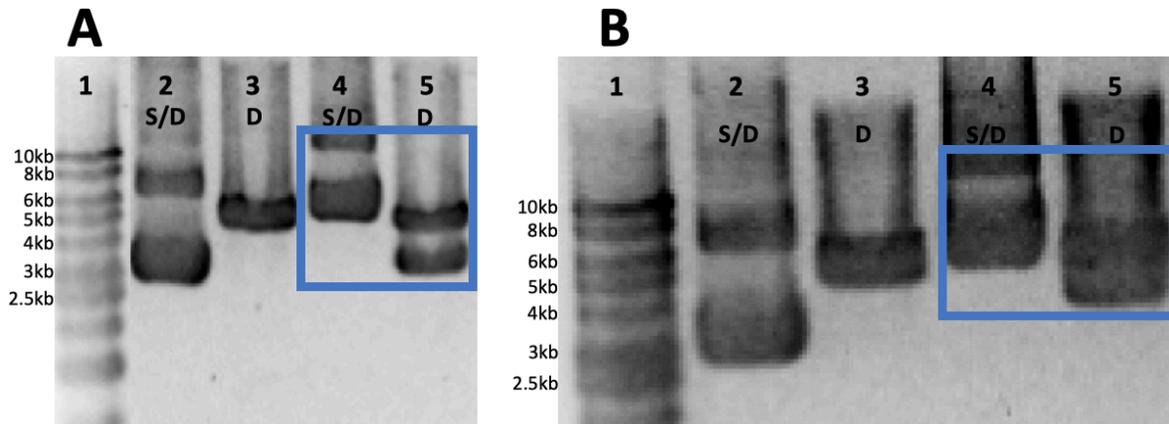


Figura 12. Verificación de clonas positivas mediante digestión enzimática de DNA plasmídico. Panel A: pRS316::*DhCTA*-yEC. Panel B: pRS316::*DhCTT*-yEC. Los carriles S/D contienen el DNA plasmídico extraído de cada clona sin digerir, mientras que los carriles D (digeridos) sí fueron incubados con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I.

Transformación de la cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* con los plásmidos construidos

La cepa acatalasémica *BY4748/3* se transformó con cada plásmido por separado (tanto los plásmidos que contienen las fusiones catalasa-yECitrine, como los plásmidos que contienen únicamente el gen de cada catalasa) mediante el protocolo estándar de transformación de levaduras descrito en la metodología. El medio de selección utilizado fue medio mínimo *ura*⁻ adicionado con aminoácidos para complementar las auxotrofías de la cepa acatalasémica.

Para determinar el éxito y la eficiencia de la transformación, es decir si ésta realmente complementó la actividad de catalasa en las cepas transformadas, se realizaron pruebas rápidas de actividad de catalasa (pág. 27). De las ocho colonias transformadas con *DhCTA* (fusionada o no a yECitrine) utilizadas para la prueba rápida de actividad, todas presentaron actividad de catalasa en la placa; por otro lado, sólo tres colonias transformadas con *DhCTT* y cuatro colonias transformadas con *DhCTT*-yEC complementaron la actividad de catalasa (tabla 9). Con este resultado podemos concluir que la fusión de los genes de catalasa al gen de yECitrine no afecta la proporción en que las colonias transformadas complementan la actividad de catalasa

Tabla 9. Prueba rápida de actividad de catalasa realizada en colonias transformadas con los genes de las catalasas, fusionadas o no a yECitrine.

Inserto/Colonia	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>DhCTA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>DhCTA-yEC</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>DhCTT</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>DhCTT-yEC</i>	+	+	+	-	-	-	-	+

Tras este ensayo, se seleccionó una clona de cada cepa que presentara actividad de catalasa para realizar todos los experimentos.

Caracterización de las cepas complementadas heterológamente

Para caracterizar a cada cepa se realizaron curvas de crecimiento y ensayos de actividad específica de catalasa; sólo en el caso de las cepas transformadas con las fusiones catalasa-yECitrine, las células fueron analizadas por citometría de flujo y microscopía confocal. Debido a las diferencias en el comportamiento de las cepas transformadas con *DhCTA* o *DhCTT*, los resultados de todos los experimentos para cada catalasa se muestran por separado a partir de este momento.

Caracterización de la cepa complementadas heterológamente con *DhCTT* o *DhCTT-yEC*

La complementación con *DhCTT* no tiene efecto en la dinámica de crecimiento

Para determinar si la fusión a un reportero fluorescente afectaba la dinámica de crecimiento de las cepas transformadas, se procedió a estudiar las curvas de crecimiento en los diferentes medios de cultivo experimentales: glucosa (YPD), glucosa con sal (YPD-NaCl 0.6 M), etanol (YPE) y etanol con sal (YPE-NaCl 0.6 M). La composición detallada de los medios se encuentra en la tabla 3. Las cepas transformadas con *DhCTT* o con *DhCTT-yEC* no mostraron diferencias en la dinámica de crecimiento al variar la fuente de carbono, ni en presencia o ausencia de sal, con respecto a la cepa acatalasémica (figura 14 y tabla 10).

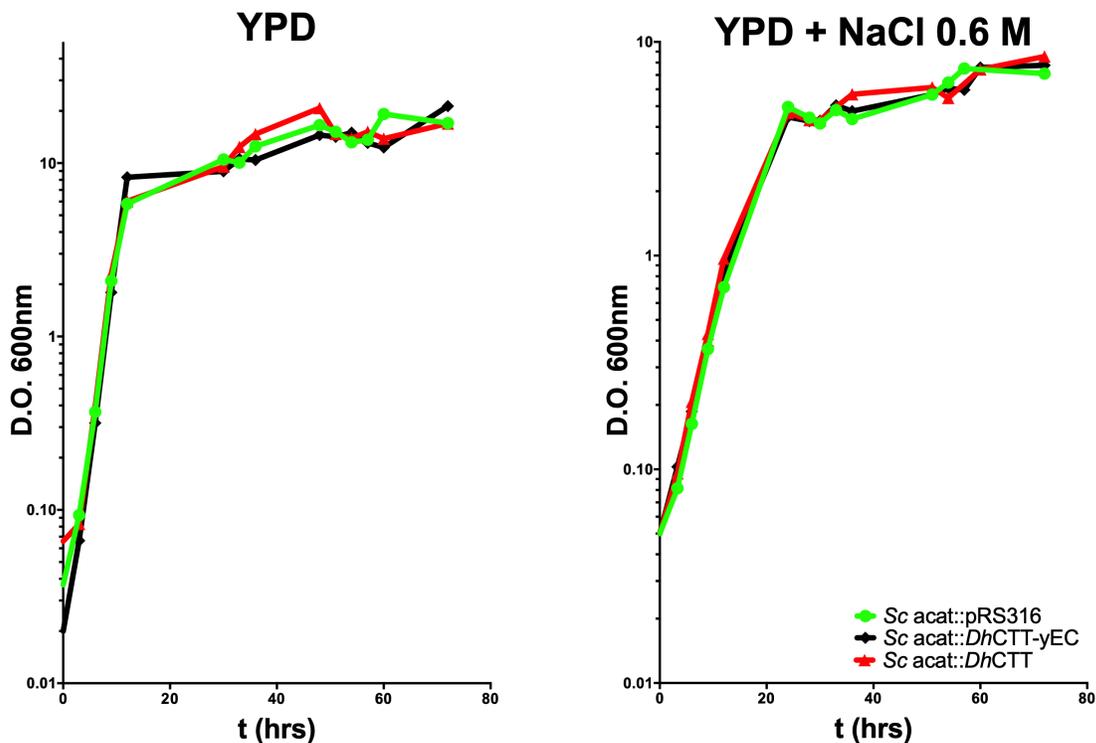


Figura 14 (1ra parte). Curvas de crecimiento de las cepas transformadas con *DhCTT* (rojo), *DhCTT-yEC* (negro) y la cepa acatalasémica (verde) en los medios de cultivo con glucosa (YPD) y glucosa con sal (YPD + NaCl 0.6 M). Las cepas fueron crecidas simultáneamente en cada medio y las mediciones se realizaron en el espectrofotómetro en los mismos intervalos de tiempo.

Tabla 10. Tiempos de duplicación de las cepas transformadas con *DhCTT* en los diferentes medios de cultivo.

Cepa/Medio de cultivo	YPD	YPD + NaCl 0.6 M	YPE	YPE + NaCl 0.6 M
<i>Sc acat</i> + pRS316	1.6 h	2.8 hrs	7.9 hrs	8.4 hrs
<i>Sc acat</i> + pRS316:: <i>DhCTT</i>	1.6 h	2.8 hrs	7.8 hrs	8.5 hrs
<i>Sc acat</i> + pRS316:: <i>DhCTT-yEC</i>	1.6 h	2.8 hrs	7.9 hrs	8.4 hrs

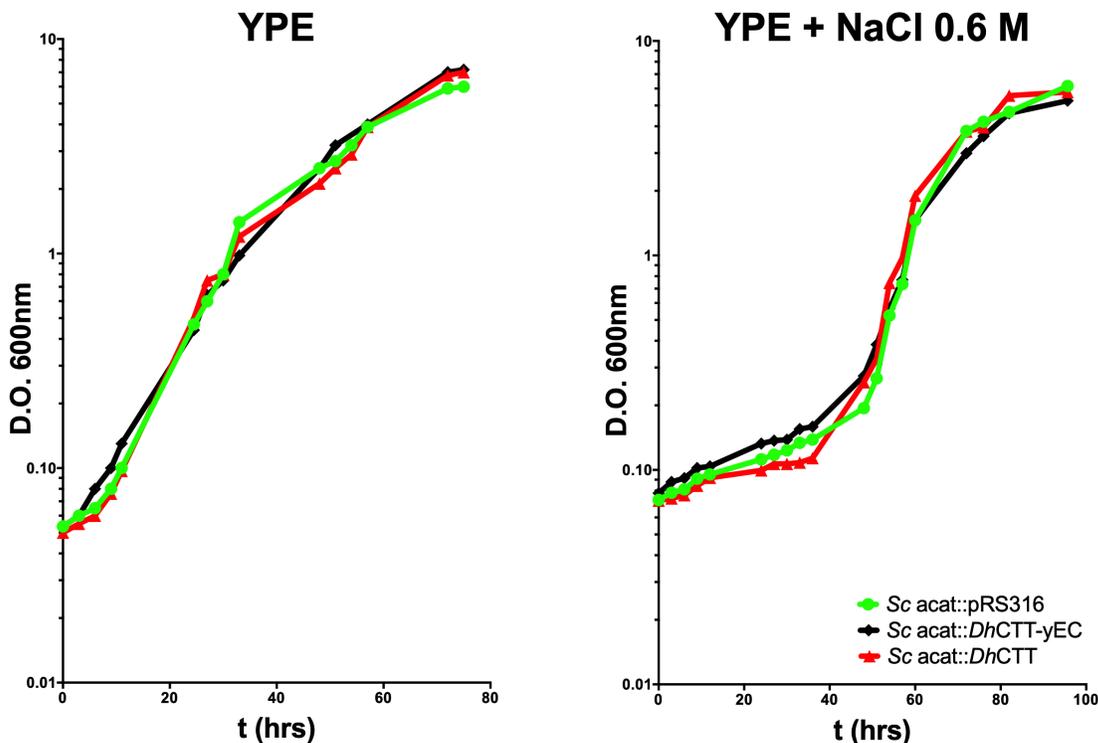


Figura 14 (2da parte). Curvas de crecimiento de las cepas transformadas con *DhCTT* (rojo) *DhCTT-yEC* (negro) y la cepa acatalasémica (verde) en los medios de cultivo con etanol (YPE) y etanol con sal (YPE + NaCl 0.6 M).

Las cepas complementadas con *DhCTT* no presentan actividad de catalasa

Debido a que las diferencias en la resistencia al estrés oxidante entre *D. hansenii* y *S. cerevisiae* sólo son evidentes durante la fase de crecimiento exponencial en cultivo [Segal-Kischinevzky *et al*, 2011] y como primera aproximación para determinar si las células expresaban al gen *DhCTT*, fusionado o sin fusionar a yECitrine, se realizaron ensayos de actividad específica de catalasa en extractos crudos de proteína obtenidos en fase de crecimiento exponencial.

Como cepas de referencia para estos ensayos, se utilizaron la cepa acatalasémica (*Sc acat*), una cepa silvestre de *S. cerevisiae* (*Sc WT*) y una cepa silvestre de *D. hansenii* (*Dh WT*). El método de detección fue adaptado por Segal-Kischinevzky y su grupo [2011] a partir del reportado por Aebi [1984], que consiste en medir el descenso de la concentración del H_2O_2 provocado por la actividad de catalasa mediante métodos espectrofotométricos, midiendo la absorbancia de la reacción a 240 nm en una celda de cuarzo durante tres minutos.

En el caso de *Sc WT* en medio YPD, los niveles de actividad de catalasa se encontraban por debajo del límite de detección. Sin embargo, en el medio YPD-sal se detectó una actividad de catalasa de aproximadamente 8 μ moles de H_2O_2 oxidados/minuto/mg de proteína. A su vez, la actividad en medio YPE aumentó

dos veces y alcanzó niveles hasta ocho veces más altos en medio YPE-sal (figura 15, columna A). La cepa acatalasémica se utilizó como control negativo de la actividad específica de catalasa (figura 15, columna B).

Por otro lado, la actividad de catalasa de *D. hansenii* fue considerablemente mayor que en *S. cerevisiae* y se detectó en todos los medios de cultivo. En medio YPD, la actividad es de aproximadamente 40 μ moles de H_2O_2 oxidados/minuto/mg de proteína, y esta aumenta 5 veces cuando se añade sal al medio. En medio YPE, la actividad fue hasta 10 veces mayor con respecto al medio con glucosa y, de forma interesante, hubo una ligera reducción en la actividad en medio YPE-sal (figura 15, columna E).

En el caso de las dos cepas transformadas con *DhCTT*, la actividad de catalasa no fue detectada en ninguna de las cuatro condiciones, sugiriendo que las células no están expresando la proteína o que esta se encuentra inactivada como se había propuesto en el trabajo de Segal-Kischinevzky [2011] (figura 15, columnas C y D). Es importante recordar que estos experimentos se realizaron con una cepa que presentó actividad de catalasa en placa después de la transformación, lo que implica que la actividad de catalasa se pierde durante el crecimiento de las células en cultivo líquido.

Actividad específica de catalasa

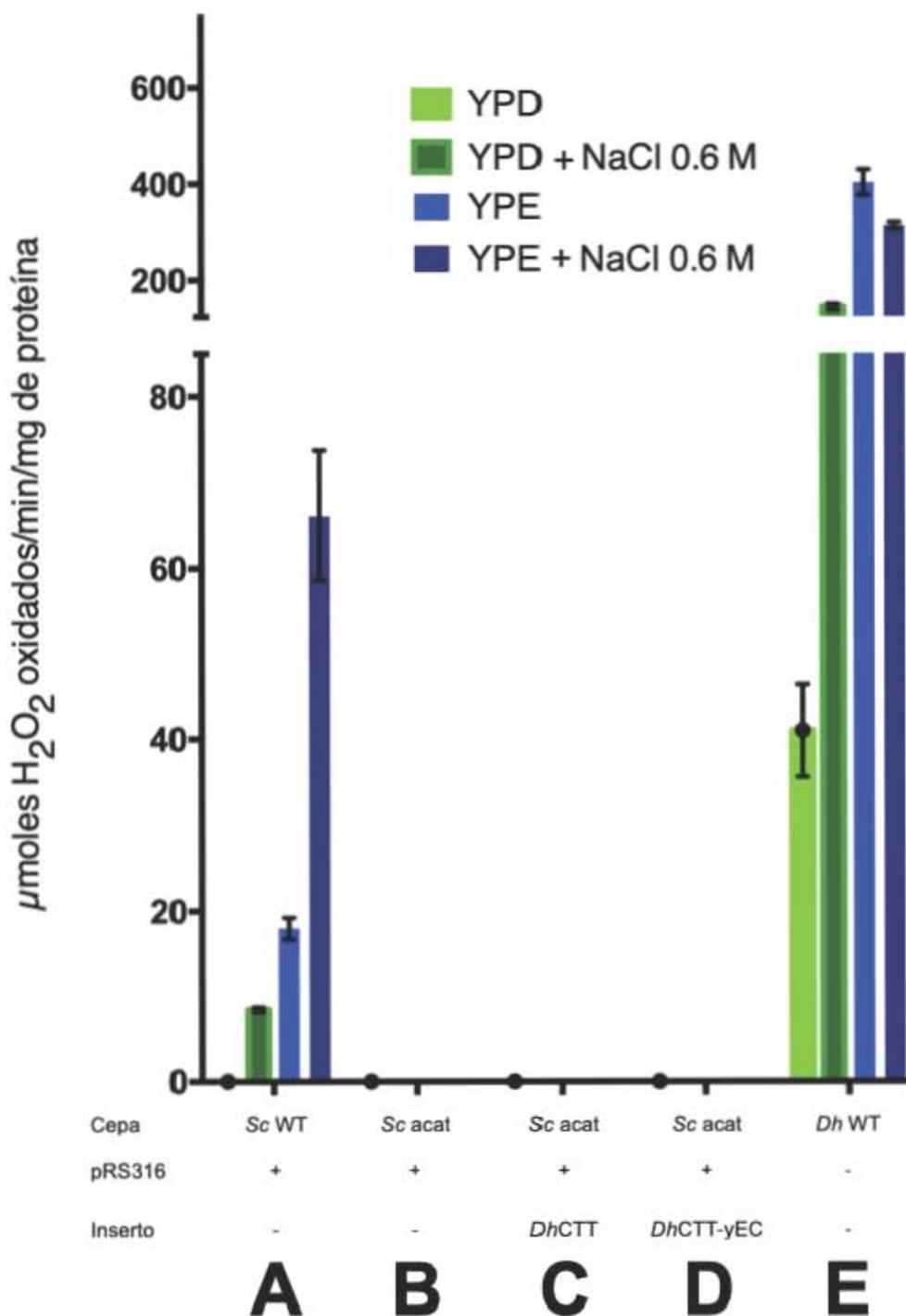


Figura 15. Actividad específica de catalasa por cepa en los diferentes medios de cultivo en fase de crecimiento exponencial. En el eje x se indica el nombre de cada cepa en la primera fila, si contenían o no el plásmido pRS316 en la segunda fila y el inserto contenido dentro del plásmido en la tercera fila. La gráfica representa los resultados promediados de tres experimentos independientes y las barras de color negro representan la desviación estándar en todos los casos. Código de color: verde claro=medio con glucosa; verde oscuro=medio con glucosa y sal; azul claro=medio con etanol; azul oscuro=medio con etanol y sal).

Las células *DhCtt*-positivas sólo son detectables en medio con etanol y sal

El objetivo de construir las fusiones catalasa-proteína fluorescente fue determinar la presencia o ausencia de proteína en las cepas transformadas para explorar la posibilidad de que esta se encontrara inactivada como sugirió Segal-Kischinevzky [2011]. Para ello, se analizaron células de cultivos en fase exponencial de la cepa transformada con el inserto *DhCTT*-yEC mediante citometría de flujo. Como control negativo, se analizó la cepa acatalasémica para definir si las células eran positivas para la proteína quimérica Ctt-yEC. En todos los casos se colectaron 50,000 eventos y cada experimento se realizó por duplicado.

Para determinar si la distribución de los datos de intensidad de fluorescencia era diferente para la cepa *Sc acat* + pRS316::*DhCTT*-yEC con respecto a la acatalasémica en cada medio de cultivo, se realizó una prueba estadística de U de Mann-Whitney. En los casos en que la prueba determinó que las distribuciones de los datos son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$), se muestra el porcentaje de células consideradas como positivas (figura 16).

En los medios YPD, YPD-sal y YPE no fue posible detectar células Ctt-yEC positivas; sin embargo, una pequeña proporción de células (6%) resultaron positivas para esta proteína en el medio YPE-sal (figura 16). Esta observación nos permite sugerir que una proporción tan baja de células expresando la proteína no es suficiente para detectar actividad de catalasa con el método utilizado ni para tener un efecto en la dinámica de crecimiento de todo el cultivo.

El hallazgo principal de este ensayo fue que la falta de actividad de catalasa se debía directamente a la ausencia de la proteína en los diferentes medios; además, el resultado obtenido en el medio YPE-sal sugiere que las células están respondiendo de forma heterogénea a las condiciones del cultivo. Es importante señalar el hecho de que la presencia o ausencia de la proteína en este análisis está definida únicamente en términos estadísticos y que estos resultados no implican que las células determinadas como 'negativas' no estén expresando la proteína.

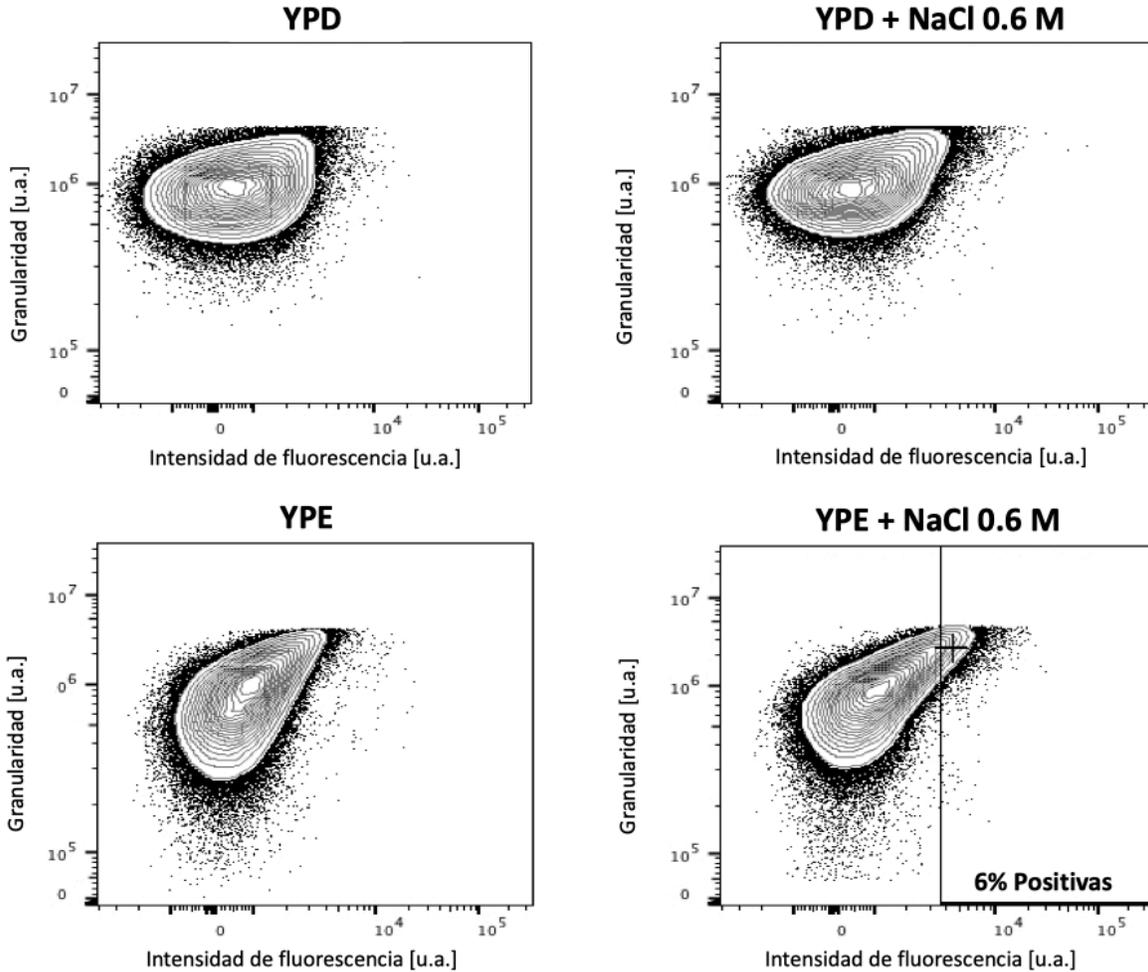


Figura 16. Análisis por citometría de flujo de las células transformadas con el inserto *DhCTT-yEC* en los cuatro medios de cultivo. En todos los casos, el eje X indica la intensidad de fluorescencia y el eje Y indica la granularidad de cada célula; n = 50000. El límite de detección de células positivas se estableció considerando la media geométrica del control negativo más dos desviaciones estándar según lo recomendado por Davies [2015].

La proteína *DhCtt* está presente en todos los medios de cultivo, aunque en niveles muy bajos.

Para explorar si la ausencia de células Ctt-yEC positivas en el análisis por citometría de flujo en realidad se debía a que esta proteína se encontraba en niveles demasiado bajos, las células fueron observadas vivas mediante microscopía confocal. En este caso también se utilizó a la cepa acatalasémica como control negativo; la señal de auto-fluorescencia detectada en esta cepa en los diferentes medios fue corregida utilizando la herramienta *Image Calculator* del software Image J, restando el promedio de la señal detectada en el control negativo al resto de las imágenes, según lo sugerido por Billinton y Knight [2001]. La intensidad promedio de esta señal se restó a todas las muestras, lo que permitió discernir entre niveles reducidos de proteína y su ausencia total.

De forma general, se observa el mismo patrón encontrado mediante la citometría de flujo: los niveles de proteína dentro de las células fueron muy bajos en los medios YPD, YPD-sal y YPE, pero se encontró un ligero incremento en el medio YPE-sal. A pesar de que la intensidad de fluorescencia fue muy baja en todos los medios de cultivo, es importante señalar que la intensidad de fluorescencia promedio no fue cero en ninguno de los casos. Por otro lado, resulta interesante que la desviación estándar de la población va incrementando en cada uno de los medios de cultivo; esto corrobora que la población está respondiendo de forma heterogénea al estrés dentro del mismo cultivo (figura 17), además de que esta heterogeneidad se incrementa según la intensidad del estrés impuesto por el medio de cultivo (sal +; etanol ++; etanol y sal +++).

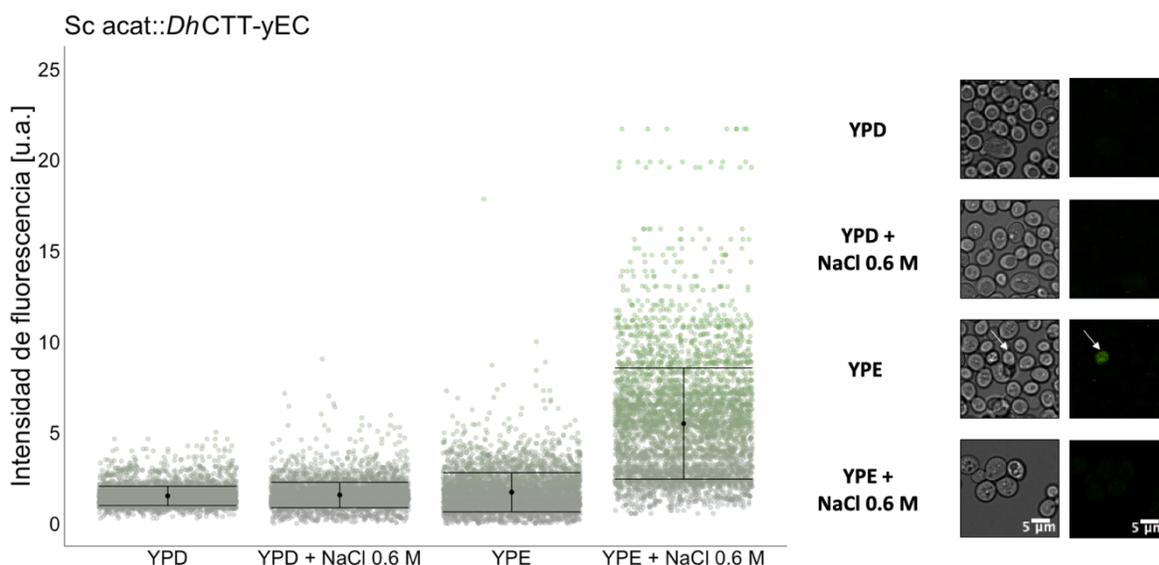


Figura 17. Análisis de la cepa *Sc acat* + pRS316::*DhCTT-yEC* mediante microscopía confocal en los diferentes medios de cultivo. En el panel izquierdo se muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia y cada punto representa una célula individual. El punto y las barras de color negro representan la intensidad media de fluorescencia y la desviación estándar de la población, respectivamente. En cada caso se analizaron al menos 4500 células.

El panel derecho muestra una imagen representativa de las células en cada medio de cultivo en campo claro y la señal de fluorescencia detectada a 520nm. La flecha blanca en la imagen del medio YPE muestra una célula que expresa claramente a la proteína Ctt-yEC; la intensidad de fluorescencia de esta célula está fuera de la escala representada.

Caracterización de la cepa complementadas heterológamente con *DhCTA* o *DhCTA-yEC*

La complementación con *DhCTA* favorece la dinámica de crecimiento cuando el etanol es la única fuente de carbono

En el caso de las cepas *Sc acat* + pRS316::*DhCTA* y *Sc acat* + pRS316::*DhCTA-yEC* sí se logró identificar un fenotipo claro al analizar las curvas de crecimiento. Cuando las células fueron crecidas en los medios YPD y YPD-sal, la dinámica de crecimiento fue exactamente igual a la de la cepa acatalasémica (figura 18,

primera parte y tabla 11); sin embargo, en los medios YPE y YPE-sal las cepas transformantes crecieron a una mayor velocidad que la cepa acatalasémica (figura 18, segunda parte y tabla 11), aunque al terminar el experimento todas las cepas alcanzaron aproximadamente la misma biomasa. Esto sugiere que la expresión del gen *DhCTA* se induce por la presencia del etanol y que esto favorece el crecimiento de la levadura cuando éste es la única fuente de carbono disponible.

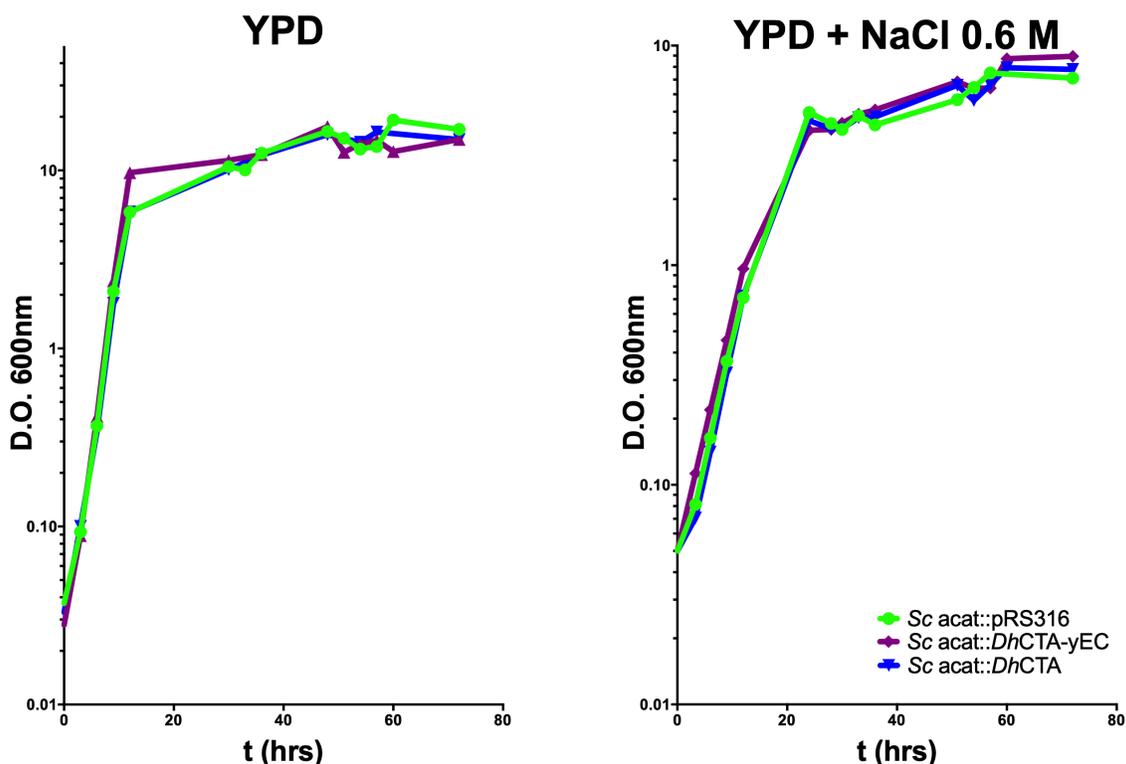


Figura 18 (1ra parte). Curvas de crecimiento de las cepas transformadas con *DhCTA* o *DhCTA-yEC* y la cepa acatalasémica en los medios de cultivo con glucosa (YPD) y glucosa con sal (YPD + NaCl 0.6 M). Las cepas fueron crecidas simultáneamente en cada medio y las mediciones se realizaron en el espectrofotómetro en los mismos intervalos de tiempo.

Tabla 11. Tiempos de duplicación de las cepas transformadas con *DhCTA* en los diferentes medios de cultivo.

Cepa/Medio de cultivo	YPD	YPD + NaCl 0.6 M	YPE	YPE + NaCl 0.6 M
<i>Sc acat</i>	1.6 h	2.8 hrs	7.9 hrs	8.4 hrs
<i>Sc acat</i> + <i>pRS316::DhCTA</i>	1.6 h	2.8 hrs	6.2 hrs	7.7 hrs
<i>Sc acat</i> + <i>pRS316::DhCTA-yEC</i>	1.6 h	2.8 hrs	6.0 hrs	7.5 hrs

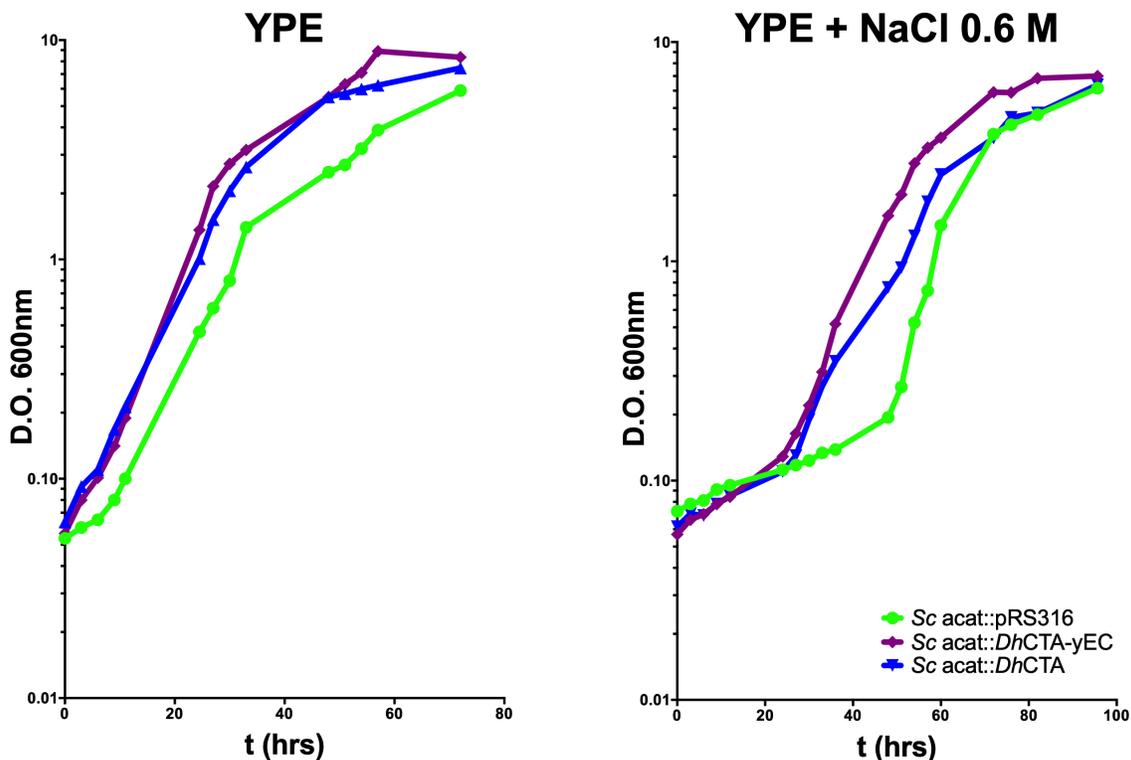


Figura 18 (2da parte). Curvas de crecimiento de las cepas transformadas con *DhCTA* o *DhCTA-yEC* y la cepa acatalasémica en los medios de cultivo con etanol (YPE) y etanol con sal (YPE + NaCl 0.6 M).

Las cepas transformadas con *DhCTA* presentan niveles elevados de actividad de catalasa elevada en los medios con etanol como fuente de carbono

Para realizar la cuantificación de la actividad específica de catalasa de estas cepas, también se utilizaron como referencia la cepa acatalasémica (*Sc acat*), una cepa silvestre de *S. cerevisiae* (*Sc WT*) y una cepa silvestre de *D. hansenii* (*Dh WT*); los perfiles de actividad de estas tres cepas son exactamente los mismos descritos con anterioridad.

Las cepas transformantes *Sc acat* + pRS316::*DhCTA* y *Sc acat* + pRS316::*DhCTA-yEC* no mostraron actividad de catalasa detectable en los medios YPD y YPD-sal. En medio YPE, la actividad de ambas cepas fue de aproximadamente 50 μ moles de H_2O_2 oxidados/minuto/mg de proteína y en ambos casos se observa una ligera disminución en los niveles de actividad en el medio YPE-sal, comportamiento similar al que se observa en *D. hansenii* en los medios de cultivo con etanol como fuente de carbono (figura 19). Con este resultado y el de las curvas de crecimiento, se corrobora que la fusión al reportero fluorescente no afecta el comportamiento de las catalasas al ser expresadas en *S. cerevisiae*.

Actividad específica de catalasa

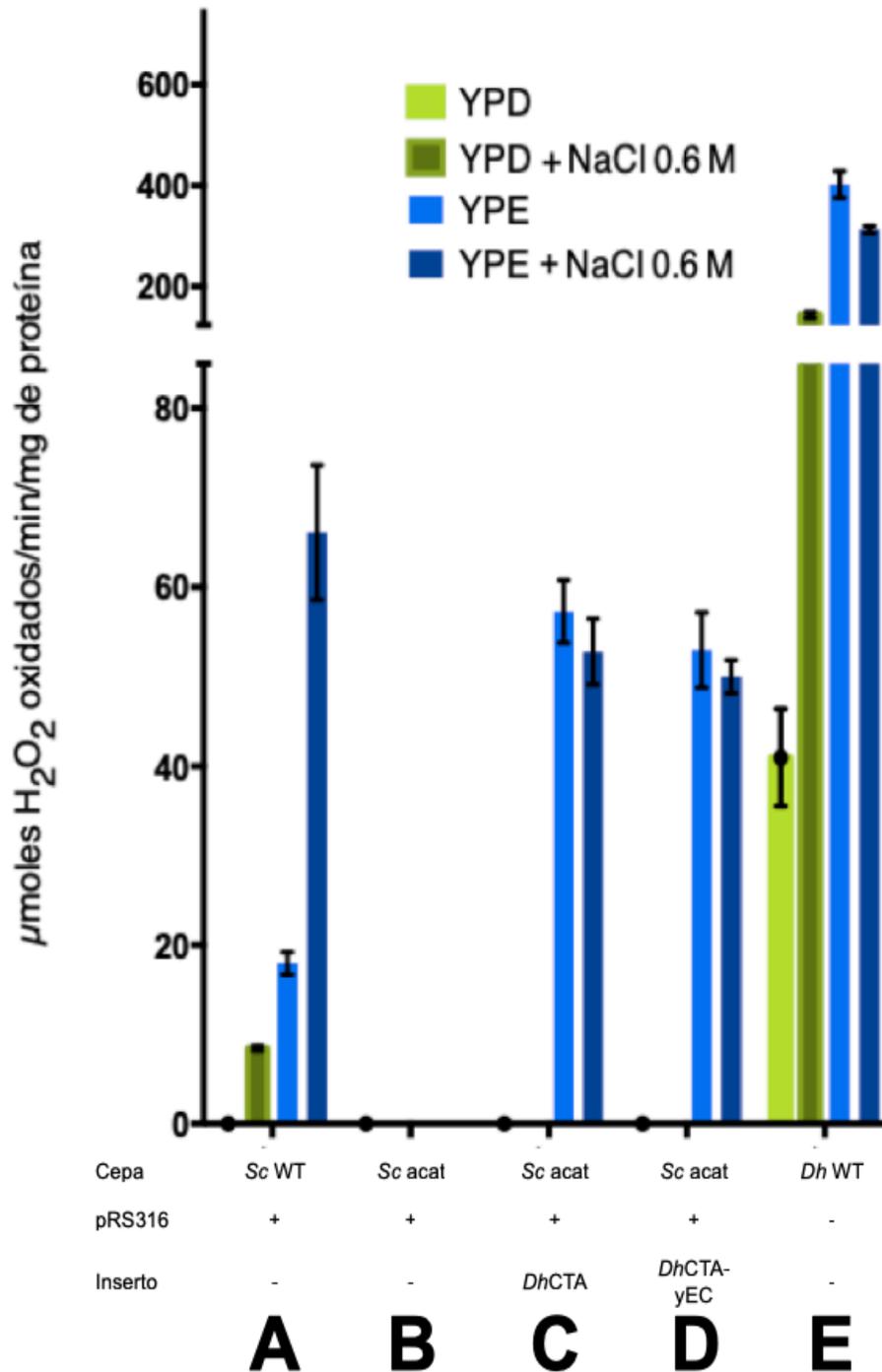


Figura 19. Actividad específica de catalasa por cepa en los diferentes medios de cultivo en fase de crecimiento exponencial. En el eje x se indica el nombre de cada cepa en la primera fila, si contenían o no el plásmido pRS316 en la segunda fila y el inserto contenido dentro del plásmido en la tercera fila. La cepa acatalasémica se utilizó como control negativo y no presenta actividad en ningún caso. La gráfica representa los resultados promediados de tres experimentos independientes y las barras de color negro representan la desviación estándar en todos los casos. Código de color: verde claro=medio con glucosa; verde oscuro=medio con glucosa y sal; azul claro=medio con etanol; azul oscuro=medio con etanol y sal).

El porcentaje de células Cta positivas se incrementa en presencia de etanol en el medio de cultivo

Aunque el fenotipo de las cepas transformadas con *DhCTA* resultó evidente con las curvas de crecimiento y los ensayos de actividad específica, los cultivos de la cepa transformada con *DhCTA-yEC* también fueron analizados mediante citometría de flujo para determinar el comportamiento de la proteína Cta-yEC en células individuales en cada medio de cultivo en la fase de crecimiento exponencial. Como control negativo, se analizó la cepa acatalasémica. En todos los casos se colectaron 50,000 eventos y cada experimento fue realizado por duplicado.

A pesar de que en los medios YPD y YPD-sal no se detectó actividad de catalasa, se detectó un 8% y un 5% de células Cta-yEC positivas respectivamente (figura 20). Similar a lo que se encontró con la cepa *Sc acat + pRS316::DhCTT-yEC* en medio YPE-sal, parece ser que un porcentaje tan bajo de células expresando la catalasa no contribuyen de manera significativa a la actividad o la dinámica de crecimiento de todo el cultivo.

El porcentaje de células consideradas como positivas en medio YPE fue de aproximadamente 34%, y en medio YPE-sal esta proporción se redujo hasta el 27% (figura 20). Aunque este comportamiento coincide con los niveles de actividad detectados en los extractos proteicos, de nuevo se observa que la población está respondiendo de forma heterogénea a las condiciones del cultivo, pues menos de la mitad de las células expresan la proteína Cta-yEC.

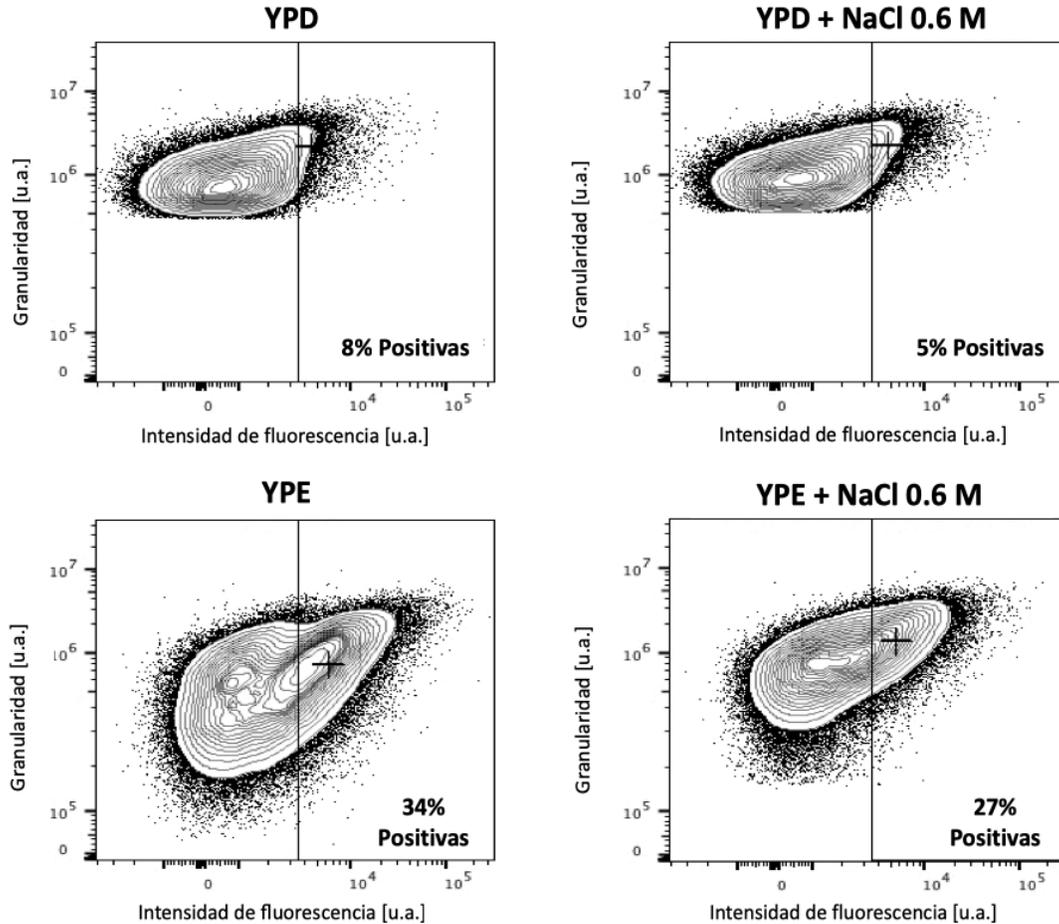


Figura 20. Análisis por citometría de flujo de las células transformadas con el inserto *DhCTA-yEC* en los cuatro medios de cultivo. En todos los casos, el eje X indica la intensidad de fluorescencia y el eje Y indica la granularidad de cada célula; n = 50000. El límite de detección de células positivas se estableció considerando la media geométrica del control negativo más dos desviaciones estándar según lo recomendado por Davies [2015].

La expresión de *DhCTA* presenta un perfil de variegado

Para analizar más a fondo el comportamiento heterogéneo observado mediante la citometría de flujo, las células de la cepa *Sc acat* + pRS316::*DhCTA-yEC* también fueron observadas mediante microscopía confocal.

Similar a lo que se encontró en el caso de *Ctt*, las células transformadas con el inserto *DhCTA-yEC* mostraron un comportamiento bastante homogéneo en los medios YPD y YPD-sal, registrándose niveles de fluorescencia muy cercanos a cero en todas las células. Sin embargo, el comportamiento heterogéneo se volvió muy evidente en los medios YPE y YPE-sal, pues en ambas condiciones se logró identificar a dos sub-poblaciones claramente distintas: una población se encontraba expresando la proteína *Cta-yEC* (29% en YPE y 23% en YPE + NaCl) y otra población que no presentaba fluorescencia (figura 21). Cabe destacar que no se encontraron muchas células en un estado intermedio.

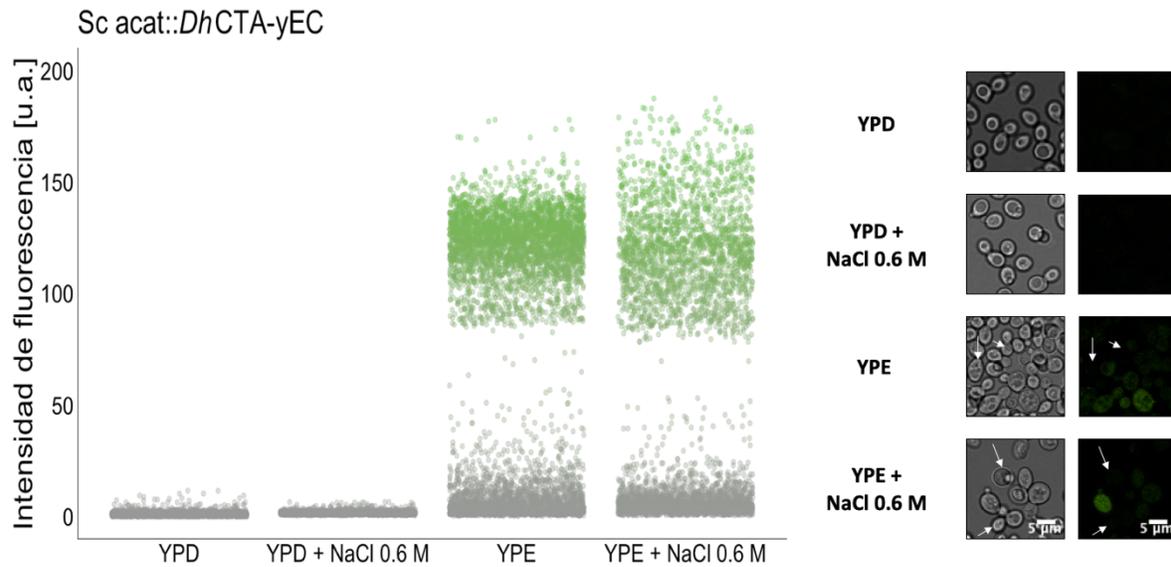


Figura 21. Análisis de la cepa *Sc acat* + pRS316::*DhCTA-yEC* mediante microscopía confocal en los diferentes medios de cultivo. En el panel izquierdo se muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia y cada punto representa una célula individual; en cada caso se analizaron al menos 4500 células. Debido a la evidente presencia de dos poblaciones distintas en los medios con etanol, no se muestran la media ni la media estándar. El panel derecho muestra una imagen representativa de las células en cada medio de cultivo en campo claro y la señal de fluorescencia detectada a 520nm. En este caso, las flechas blancas señalan a las células que no están expresando la proteína Cta-yEC.

DISCUSIÓN

Al analizar las curvas de crecimiento de todas las cepas estudiadas observamos que independientemente del comportamiento individual de cada cepa, todas alcanzaron una mayor biomasa en el medio rico YPD, considerado el medio control, con respecto a los otros tres medios de cultivo. Esto comprueba que la adición de sal o etanol al medio representa un estrés significativo para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, bajo el cual se puede esperar que se induzca la expresión de diferentes genes de respuesta a estrés, entre ellos los de la respuesta antioxidante.

En las cepas transformadas con *DhCTT* no se pudo identificar ningún fenotipo en la dinámica de crecimiento, sugiriendo que la transformación con este gen no proporciona ninguna ventaja a las células en las condiciones de estrés evaluadas. Por otro lado, en el caso de las cepas transformadas con *DhCTA* sí se identificó un fenotipo de crecimiento acelerado en los medios con etanol como fuente de carbono con respecto a la cepa acatalasémica, probando el papel protector de *DhCTa* ante el estrés oxidante generado por el metabolismo del etanol. Además, se encontró que dichos fenotipos se correlacionan directamente con el perfil de actividad de catalasa de cada cepa.

La similitud en la dinámica de crecimiento de las cepas *Sc acat* + pRS316::*DhCTT* y *Sc acat* + pRS316::*DhCTT*-yEC con la cepa acatalasémica probó ser resultado de una falta de actividad específica, sugiriendo en principio que las células no estaban expresando la proteína, tal vez por un problema de reconocimiento del promotor nativo de *D. hansenii*. Las cepas *Sc acat* + pRS316::*DhCTA* y *Sc acat* + pRS316::*DhCTA*-yEC exhibieron una mayor velocidad de crecimiento con respecto a la cepa acatalasémica en los medios YPE y YPE-sal, en donde también presentaron niveles elevados de actividad específica de catalasa.

Izawa y colaboradores [1996] reportaron uno de los primeros trabajos relativos al fenotipo que presentaba *S. cerevisiae* cuando se removían uno o los dos genes de catalasas de su genoma. Se encontró que las mutantes deficientes de los genes de catalasa no tenían ninguna dificultad para crecer en medio rico con glucosa como fuente de carbono, similar a lo reportado en este trabajo. Sin embargo, al crecer a las células en condiciones de estrés oxidante (añadiendo diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno al medio) encontraron algo sumamente interesante: durante la fase exponencial, la presencia o ausencia de los genes de catalasa no les confirió ninguna resistencia a las células para contender contra el estrés oxidante, mientras que su presencia resultó en un fenotipo de resistencia durante la fase de crecimiento estacionario.

En sintonía con estos resultados, Ma y Eaton [1992] reportaron que la catalasa no tenía un papel protector contra el peróxido de hidrógeno en cultivos de *Escherichia coli* con una baja densidad celular, mientras que en cultivos con un gran número de células la catalasa representaba una ventaja adaptativa contra las condiciones

de estrés oxidante. Se han reportado resultados muy similares también para *Salmonella typhimurium* [Buchmeier *et al*, 1995]. Los resultados reportados por Izawa y su grupo [1996] proporcionan una prueba de que el fenómeno de resistencia a estrés oxidante mediado por la actividad de catalasa en poblaciones de una alta densidad celular está conservado en organismos unicelulares, procariontes y eucariontes.

Con esto en mente, concluimos que la razón por la cual las cepas transformadas con el gen *DhCTT* no presentaron actividad de catalasa es que los ensayos se realizaron con células provenientes de cultivos en fase exponencial, pues en otros experimentos realizados en el laboratorio sí se ha logrado detectar actividad en cultivos de estas cepas en fase estacionaria [Castillo-Díaz, 2013; García-Campos, 2014; de la Fuente-Colmenares, 2017].

A diferencia de lo que se encontró con *DhCTT*, la expresión heteróloga del gen *DhCTA* sí resultó ser una ventaja durante toda la fase exponencial en las cepas transformantes, pues presentaron una tasa de crecimiento más rápida que la cepa acatalasémica que correlaciona con niveles altos de actividad específica de catalasa. Los trabajos de otro grupo de investigación en torno a las catalasas de *S. cerevisiae*, a su vez, han arrojado resultados muy similares a los de nuestro laboratorio. Luschak y colaboradores [2005] encontraron que la cepa acatalasémica presentaba una tasa de crecimiento mucho más lenta que las mutantes sencillas Δcta y Δctt o que la cepa silvestre y que la actividad específica de catalasa siempre se encuentra elevada en medios de cultivo donde el etanol es la única fuente de carbono. Además, reportaron que crecer en estos medios también provocaba un aumento en los niveles de actividad de la superóxido dismutasa (SOD), enzima encargada de producir peróxido de hidrógeno y oxígeno a partir del radical superóxido generado en la mitocondria [Longo *et al*, 1996], prueba de que a pesar de que esta levadura es una fermentadora por excelencia y puede soportar concentraciones de etanol relativamente altas, este metabolito representa un estrés que activa la expresión y la actividad de las enzimas antioxidantes.

Aunque los resultados del grupo de Luschack contrastan con lo propuesto por Izawa [1996] respecto a que las catalasas de *S. cerevisiae* no participan en la detoxificación del peróxido de hidrógeno en células en crecimiento activo, es probable que este incremento en la actividad desde etapas tan tempranas del crecimiento en cultivo se deba a que la inducción del gen *DhCTA* es mucho más sensible que el de las catalasas nativas de *S. cerevisiae*.

El perfil de expresión heteróloga de las catalasas de D. hansenii

Otro aspecto que vale la pena discutir es el carácter inducible de estos genes y su regulación diferencial. Aunque se sabe que las catalasas de *S. cerevisiae* tienen un papel parcialmente redundante y que su localización (peroxisomal en el caso de Cta y citosólica en el caso de Ctt) parece no tener relevancia en los niveles de actividad [Izawa *et al*, 1996], los diferentes estudios realizados en el laboratorio en

torno a las catalasas de *D. hansenii* apuntan en otra dirección. Mientras que las células transformadas con el gen *DhCTT* alcanzan una mayor biomasa con respecto a la cepa acatalasémica [Castillo-Díaz, 2013], las células transformadas con *DhCTA* muestran únicamente una mayor velocidad de crecimiento [Noriega, 2012]. A su vez, el perfil de la expresión de ambos genes en *S. cerevisiae* tampoco es muy similar entre sí: los niveles relativos de proteína Ctt en los diferentes medios de cultivo parecen reflejar la respuesta a estrés que presenta la cepa silvestre de *S. cerevisiae* (figuras 15 y 17), mientras que el comportamiento de las cepas que expresan Cta parece reflejar la regulación en *D. hansenii* (figuras 19 y 21). Esto implica una regulación diferencial de estos dos genes: la expresión de *DhCTA* se induce por la presencia de etanol en el medio de cultivo, mientras que la expresión de *DhCTT* no responde de manera específica a la presencia de etanol o sal en el cultivo, sino a la intensidad global del estrés.

Una observación importante reportada por Izawa [1996] es que la expresión de las catalasas de *S. cerevisiae* se puede pre-inducir antes de realizar cualquier experimento mediante el tratamiento de las células con concentraciones sub-letales de peróxido de hidrógeno. Trataron a las células con peróxido de hidrógeno a una concentración de 0.2 mM antes de inocular los cultivos y encontraron que esta pre-inducción confería a las células una mayor resistencia al estrés oxidante, tanto en fase exponencial como en fase estacionaria. Martins y English [2014] repiten este protocolo de inducción y obtienen resultados muy similares, pero observan que esta resistencia aumentada sólo se presenta en medio rico y no en amortiguador de fosfatos, probando que la respuesta al estrés oxidante implica la producción *de novo* de las catalasas ante incrementos súbitos en los niveles de H₂O₂. Con estos resultados, ambos grupos de trabajo proponen que las catalasas no participan en la detoxificación de especies reactivas del oxígeno en condiciones fisiológicas y que en cambio su expresión se induce únicamente ante condiciones en donde la concentración de peróxido de hidrógeno rebasa la capacidad detoxificadora de la glutatión peroxidasa y la citocromo C peroxidasa.

Recientemente, de la Fuente-Colmenares [2017] decidió explorar este protocolo de inducción en las cepas transformadas con el gen *DhCTT* con la intención de aislar colonias que sí presentaran actividad de catalasa. Aunque el protocolo de pre-inducción arrojó resultados positivos, el proceso tuvo una muy baja eficiencia: aproximadamente una de cada cien colonias presentó actividad de catalasa después de la inducción. De cualquier forma, sus resultados implican que *S. cerevisiae* sí es capaz de reconocer el promotor nativo de *DhCTT*, pero que existe una fuerte tendencia a que este se encuentre reprimido en las células transformadas, lo cual es congruente con los resultados presentados en este trabajo.

Estos antecedentes explicarían por qué en los medios con glucosa como fuente de carbono ninguna de las cepas transformantes presentó actividad de catalasa. En estas condiciones de cultivo (medio rico, temperatura óptima de crecimiento, agitación constante), las primeras líneas de la defensa antioxidante de la célula (figura 2) tienen la capacidad de controlar la producción de EROs derivada del

metabolismo de la glucosa durante la fase de crecimiento exponencial. Además, todos los cultivos fueron iniciados a partir de pre-inóculos en medio rico, por lo que las células no han experimentado un estrés que induzca la expresión de las catalasas.

En conjunto, todos estos resultados ponen de manifiesto que estos genes, al ser expresados heterológamente en *S. cerevisiae*, se encuentran sometidos a una fuerte regulación, sugiriendo que existe la necesidad de explorar otras condiciones de cultivo en las que se consiga una expresión más consistente entre las cepas transformantes para poder caracterizar estas catalasas.

Citometría de flujo y microscopía confocal: El comportamiento heterogéneo de las células en respuesta al estrés

El hallazgo más interesante de este trabajo es que las células reaccionan de manera heterogénea a las condiciones estresantes del cultivo, fenómeno comprobado mediante dos técnicas de detección de proteínas de alta sensibilidad. Mientras que en el caso de la cepa transformada con el gen *DhCTT* se puede observar un incremento en la desviación estándar – variabilidad en la distribución de la población – al incrementar las condiciones de estrés, en el caso de la cepa transformada con el gen de la catalasa A, se observaron dos poblaciones claramente diferentes en las condiciones en las que se indujo su expresión (figura 21).

Cuando diferentes individuos (células en este caso) de una población clonal genéticamente idéntica expresan de forma diferencial un mismo promotor, se dice que nos encontramos frente a un evento de variegación transcripcional. Cuando esto ocurre, a pesar de que todas las células se encuentran sometidas a las mismas presiones y a los mismos estímulos ambientales, se puede diferenciar una población de células que expresan un promotor particular, llámese a esto “estado activo” y otra población de células que no lo está expresando, en “estado inactivo”. A este promotor que se expresa de forma diferencial en la población se le llama promotor variegado o heterogéneo (*variegating promoter*) [Bumgarner, 2008]. Un aspecto muy interesante de este fenómeno es que una célula que se encuentra en estado inactivo puede dar origen tanto a células en estado inactivo como a células en estado activo en igual proporción y viceversa, lo que implica que el estado de variegación es reversible.

El fenómeno de variegación no es nada nuevo en Biología y podemos observarlo en todo tipo de organismos. Se puede hablar extensamente del fenómeno de variegación por posición observado por Müller desde 1930 en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), en el que los niveles de expresión de un gen en particular (*white*, en el caso de los experimentos de Müller) dependen de su posición en el genoma, particularmente de qué tan lejos se encuentren de la región centromérica o telomérica de su cromosoma [Karpen y Spradling, 1990].

En mamíferos, por otro lado, el ejemplo más claro de este fenómeno es el silenciamiento de un cromosoma X que ocurre en todas las células somáticas de las hembras como mecanismo de compensación de la dosis génica [Migeon, 1994]. Se ha visto que el silenciamiento del cromosoma X es un evento aleatorio, es decir que en cada célula individual se puede silenciar cualquiera de las dos copias. De este modo, se forman “parches” o zonas del organismo que tienen inactivada una copia u otra de este cromosoma.

En el caso particular de las levaduras, también se reconocen diferentes ejemplos de variegación transcripcional. En *Candida albicans* y *Candida glabrata* se ha observado un fenómeno llamado “variación antigénica”, que es un evento de variegación que ha evolucionado en diferentes grupos de levaduras, especialmente en las patógenas [Bumgarner, 2008]. Se sabe que estos organismos tienen un grupo de genes agrupados en familias que codifican para diferentes proteínas de superficie (genes ALS en *C. albicans*, genes EPA en *C. glabrata* y genes FLO en *S. cerevisiae* [Halme *et al*, 2004]), y que una célula dada sólo puede expresar uno de éstos a la vez. De esta forma se genera una población con un alto índice de heterogeneidad, lo que les confiere a estos organismos la capacidad de evadir el reconocimiento antigénico del sistema inmune, pues éste no puede reconocer a todas las sub-poblaciones a la vez [Stringer y Keely, 2001].

Aún no se han identificado del todo los agentes que causan estos fenómenos de variegación en poblaciones genéticamente idénticas. En un intento por explicar las diferentes fuentes de esta variación, se han generado dos modelos o propuestas que no son mutuamente excluyentes entre sí, llámense el “modelo extrínseco” y el “modelo intrínseco” [Stockholm *et al*, 2007].

El primer modelo sostiene que los estímulos ambientales recopilados por cada célula modifican activamente el programa de expresión génica y que son éstos los que determinan en qué estado de variegación se encontrará la célula. Este modelo busca resaltar la capacidad que tienen las células de responder a las fluctuaciones que ocurren en el ambiente, tales como la disponibilidad de nutrientes y oxígeno, o bien al espacio disponible. Si este modelo explicara por sí solo el origen de los diferentes estados de variegación, deberíamos poder observar todo un gradiente fenotípico de variantes entre los extremos del estado activo y el estado inactivo del promotor heterogéneo en cuestión, fenómeno que parece estar representado en el caso de las cepas transformadas con el gen de la catalasa T (figura 17).

Sin embargo, este no siempre es el caso en la naturaleza y tampoco resultó serlo en el caso de las cepas transformadas con el gen *DhCTA*. El fenotipo de las células es bastante robusto y puede resistir pequeñas variaciones estocásticas en el ambiente, de tal modo que se produzcan sólo pequeñas variaciones alrededor de un estado fenotípico estable, tal como se observó con estas cepas en los medios YPE y YPE-sal (figura 21). En este caso se refleja el hecho de que la diferenciación no siempre es un proceso continuo, sino que en ocasiones puede

presentarse como una transición discreta entre diferentes fenotipos estables dentro de un mismo sistema.

El segundo modelo, el intrínseco, propone que los mecanismos que regulan la transición entre los diferentes estados de variegación son, como su nombre lo dice, intrínsecos a las células; de esta forma, las células regulan de forma autónoma el paso entre un estado y otro. En los casos en los que las fluctuaciones en el ambiente rebasen los límites de estabilidad de un fenotipo dado, la plasticidad se haría notar en términos de la capacidad de las células de regular su programa transcripcional **en tiempo real** y no por una propensión a diferenciarse espontáneamente. Este modelo también podría explicar el comportamiento de las células transformadas con *DhCTT*, en donde el incremento en la desviación estándar entre los diferentes medios representaría el proceso de cambio gradual. Se puede especular que, como una consecuencia de este cambio gradual, la adaptación de una variante particular a las condiciones ambientales constituiría el primer paso hacia un nuevo fenotipo.

Como se dijo anteriormente, a pesar de que en algunos casos parezca predominar uno sobre el otro, los dos modelos del origen de la variación en una población clonal no son excluyentes entre sí, sino complementarios. Si tratamos de unificar los resultados obtenidos con cada una de las cepas transformantes a la luz de estos dos modelos, se puede proponer que el comportamiento de la cepa *Sc acat + pRS316::DhCTT-yEC* refleja la primera etapa del origen de la variación en la población y la transición gradual hacia un nuevo estado fenotípico estable, mientras que el comportamiento de la cepa *Sc acat + pRS316::DhCTA-yEC* en los medios con etanol como fuente de carbono representaría el final de este proceso, en el que la población ha alcanzado un nuevo estado de equilibrio con dos poblaciones claramente distintas entre sí. Desde luego, variables como la velocidad de respuesta de las células, el número total de poblaciones diferentes entre un mismo sistema y la proporción de las mismas, así como la diferenciación entre estados fenotípicos estables, dependerán del mecanismo de regulación específico de cada promotor variegado.

A la luz de los resultados aquí presentados y los reportados por otros grupos, resultaría interesante realizar estos experimentos en cultivos de las cepas transformantes en fase estacionaria para analizar cómo se conduce el proceso de diferenciación fenotípica en las diferentes condiciones de estrés. Mi hipótesis es que en el caso de la cepa *Sc acat + pRS316::DhCTT-yEC* se encontrará una población de células que hayan concluido el proceso de diferenciación (al menos en el medio YPE-sal, en donde se encontró la mayor desviación estándar), mientras que en el caso de la cepa *Sc acat + pRS316::DhCTA-yEC* la proporción de células *Cta-yEC* positivas se verá incrementada en los medios con etanol al llegar a la fase estacionaria.

Mecanismos de regulación en el efecto de variegación

En términos de un cultivo cerrado y con agitación y temperatura constantes, se puede considerar que todas las células están sometidas a los mismos estímulos en todo momento, pues en estas condiciones no pueden generarse microambientes o nichos que afecten el estado de variegación de una población local, y en este sentido se hace evidente el papel de los mecanismos intrínsecos de la célula para dirigir el proceso de diferenciación entre un estado y otro. Con esto en mente, diferentes grupos de investigación se han dedicado a explorar los mecanismos que regulan la expresión heterogénea de un mismo gen en una población, particularmente en un contexto epigenético.

En el caso particular de los ejemplos mencionados anteriormente, se han descrito ya los diferentes mecanismos epigenéticos que regulan el fenómeno de variegación. Con respecto al efecto de variegación por posición en *D. melanogaster*, se sabe que cuando el rearreglo cromosómico que modifica la posición del gen *white* lo ubica cerca de las regiones centroméricas, las marcas epigenéticas características de la heterocromatina se expanden por acción de la proteína HP1 hasta silenciar su expresión [Roelens *et al*, 2017]. A su vez, también existen numerosos reportes que describen el silenciamiento del cromosoma X en mamíferos como un fenómeno regulado a nivel epigenético, en este caso por la expresión de un RNA largo no codificante (lncRNA) llamado *Xist* que recluta a diferentes remodeladores de la cromatina para compactar al cromosoma X. Por último, en el caso de las glucoproteínas de superficie en las levaduras *C. albicans*, *C. glabrata* y *S. cerevisiae*, también se ha descrito el papel de diferentes lncRNAs en la regulación de su expresión [Bumgarner *et al*, 2012].

Uno de los ejemplos de regulación epigenética relevantes para este trabajo se publicó recientemente por Dong y colaboradores [2018]. Este grupo trabajó con el gen de la catalasa 3 (*cat-3*) del hongo filamentoso *Neurospora crassa* y encontraron que una variante de histonas, la H2A.Z, tiene un papel represivo cuando se encuentra posicionada en los nucleosomas a lo largo del promotor y el sitio de inicio de la transcripción de *cat-3*, inhibiendo su expresión en condiciones normales. Lo interesante es que cuando se somete a este organismo a condiciones de estrés oxidante, como un choque de peróxido de hidrógeno, esta variante de histona es removida rápidamente de su posición, permitiendo la unión de *CPC1* (el homólogo de *GCN4* en *N. crassa*) y permitiendo su transcripción; cuando el agente estresante es removido, la H2A.Z vuelve a su posición original y el gen vuelve a estar reprimido [Dong *et al*, 2018]. Este trabajo tiene gran relevancia para nuestro grupo por ser el primer ejemplo descrito de regulación epigenética sobre el gen de una enzima antioxidante, y es aún más interesante para nosotros que se trate del gen de una catalasa en un modelo de ascomicetos. Además, este ejemplo también es una prueba de que el perfil de expresión de genes de respuesta a estrés es altamente dinámico y **reversible**.

Ejemplos como estos nos dan la pauta de que probablemente exista un mecanismo de regulación similar en *S. cerevisiae* sobre la expresión de sus

propias catalasas, que además podría estar actuando también sobre los genes de las catalasas de *D. hansenii*, que han probado ser genes con carácter inducible que presentan una expresión variegante.

La inducción de la actividad de catalasa: perspectivas

Considerando la hipótesis de que exista un mecanismo epigenético regulando la expresión heteróloga de las catalasas de *D. hansenii*, valdría la pena explorar más a fondo el protocolo de pre-inducción de las cepas transformantes propuesto por Izawa [1996]. Como se discutió anteriormente, se sabe que las células son capaces de responder de forma activa a un cambio súbito en las condiciones ambientales y que esta respuesta se lleva a cabo modificando el programa de expresión genética de cada célula. Por lo general, este cambio en el perfil de expresión le lleva tiempo a toda la población, y durante este estado de transición el crecimiento se encuentra inhibido o se presenta en tasas muy bajas; a este periodo de adaptación le llamamos la “fase *lag*” del crecimiento.

La exposición previa a un estímulo específico ha probado reducir el tiempo necesario para atravesar la fase *lag* cuando el estímulo inductor se vuelve a presentar y lo más interesante de este fenómeno es que se presenta aún en la progenie, es decir en células que jamás han estado expuestas al estímulo inicial [D’Urso *et al*, 2016]. El fenómeno en sí mismo se ha propuesto como un ejemplo de herencia transgeneracional o “memoria celular”, y ha sido nombrado en la literatura como *comportamiento dependiente de la historia* (*History-Dependent Behavior, HDB*). Se cree que este fenómeno les permite a las células adaptarse mucho más rápido cuando el inductor se presenta de nuevo [Cerulus, 2018].

La expresión del gen *GAL1* es sin duda el ejemplo mejor documentado de este fenómeno, y fue descrito precisamente en *S. cerevisiae* [Stockwell *et al*, 2015]. Cuando las células pasan de un medio con glucosa a uno con galactosa, se observa una expresión débil de *GAL1* con su fase *lag* asociada. Cuando esta misma población se transfiere a un medio con glucosa y eventualmente se recoloca en un medio con galactosa, la expresión de *GAL1* se incrementa a niveles mucho mayores con respecto al primer ciclo de inducción y la fase *lag* no se presenta. En un análisis más profundo, se encontró que este fenómeno puede observarse en intervalos de tiempo de hasta 12 horas después de la primera exposición, lo que corresponde aproximadamente a 5 ciclos de división celular en las levaduras en medio rico [Sood *et al*, 2017].

Aunque los mecanismos detrás de este comportamiento aún no se conocen del todo, se ha encontrado que modificaciones en el estado de la cromatina juegan un papel importante [D’Urso *et al*, 2016]. En estos trabajos se ha visto que las levaduras pueden **heredar** la información relativa al **estado de disponibilidad** de un promotor en particular. Tras el primer estímulo inductor, la maquinaria remodeladora de la cromatina removería a los nucleosomas del promotor del gen *GAL1*, dejándolo disponible para el acceso de la maquinaria transcripcional. De

esta forma, al presentarse el estímulo por segunda ocasión, el promotor ya se encontraría disponible y la transcripción sería más rápida y más eficiente.

El hecho de que tras la inducción las cepas transformantes sí presenten actividad específica de catalasa [de la Fuente-Colmenares, 2017] podría deberse a que el inóculo contiene entonces una proporción de células que ha pasado al estado activo por el choque de peróxido, es decir que expresaron la catalasa durante el periodo de estrés y son capaces de heredar esa información durante su crecimiento en el cultivo, sin necesidad de un periodo de adaptación. Como una aproximación a replicar este fenómeno, sería interesante explorar diferentes combinaciones de concentración de peróxido y tiempo de exposición, así como aumentar el número de ciclos de inducción antes de realizar los experimentos para evaluar si la actividad de catalasa se incrementa de manera significativa tras este periodo de aprendizaje en las células.

A largo plazo, también sería interesante explorar si existe un mecanismo que regule la disponibilidad del promotor de estas catalasas entre las diferentes células de una misma clona. Un experimento accesible sería determinar el posicionamiento de nucleosomas mediante un ensayo NuSA (*Nucleosome-screening-assay*) en las fases de crecimiento exponencial o estacionaria, o bien antes y después de las rondas de pre-inducción. Encontrar una diferencia en el posicionamiento de los nucleosomas a lo largo de estos promotores sugeriría que existe un mecanismo epigenético subyacente que regula la expresión de las catalasas y la transición entre el estado activo y el estado inactivo.

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta el objetivo principal de mi tesis, la conclusión más importante de este trabajo es que la fusión de los genes de las catalasas de *Debaryomyces hansenii* al gen de la proteína fluorescente yECitrine **no afecta su comportamiento** cuando son expresados heterológamente en *Saccharomyces cerevisiae*.

En este sentido, el mayor aporte de mi trabajo es la implementación de un sistema reportero de la expresión de las catalasas bastante robusto, que permitirá explorar de manera más precisa los mecanismos de regulación que actúan sobre estos genes. Además, se consiguió estandarizar dos técnicas de detección de proteínas altamente sensibles en las cepas transformadas, mismas que hasta el momento no se habían utilizado en nuestro laboratorio.

Nuestro sistema reportero nos permitió concluir de forma definitiva que *S. cerevisiae* es capaz de expresar los dos genes de las catalasas, aún fusionados a otro marco de lectura. Asimismo, se confirmó que el perfil de expresión de ambos genes es muy diferente. A continuación, se enlistan las principales observaciones derivadas de cada experimento para cada catalasa por separado.

DhCTT

- La complementación heteróloga con el gen de la catalasa T de *D. hansenii* no modifica la dinámica de crecimiento de las cepas transformantes con respecto a la cepa acatalasémica en las condiciones de cultivo evaluadas.
- En sintonía con este resultado, la actividad de Ctt no alcanzó niveles detectables por nuestro método en las condiciones de cultivo evaluadas.
- Sólo es posible detectar células positivas para la proteína Ctt en el medio de cultivo YPE + NaCl 0.6 M, aunque en un porcentaje muy bajo.
- Los niveles relativos de proteína se incrementan, aparentemente de forma acumulativa, según la intensidad del estrés impuesto por las condiciones del cultivo (glucosa +, glucosa-sal ++, etanol +++, etanol-sal ++++).
- Finalmente, la observación más interesante de estos análisis es que la población no responde de manera uniforme al estrés impuesto por el cultivo: existen células que están expresando la catalasa T en niveles bajos y células que no la expresan. A medida que el estrés se incrementa, también lo hace la desviación estándar, descrita como el grado de heterogeneidad en la respuesta que despliega cada célula dentro de la población.

DhCTA

- La complementación heteróloga con *DhCTA* favorece la dinámica de crecimiento cuando el etanol es la única fuente de carbono, pero no tiene ningún efecto cuando la fuente de carbono es la glucosa.
- La actividad específica de Cta no fue detectable en los medios con glucosa como fuente de carbono, con y sin sal. En cambio, la actividad se induce en medios de cultivo con etanol como fuente de carbono y es reprimida ligeramente por la presencia de sal.
- El análisis por citometría de flujo corroboró que la presencia o ausencia de actividad específica de catalasa se correlaciona con la presencia o ausencia de proteína dentro de las células de la población.
- La proporción de células que expresan la catalasa A aumenta considerablemente cuando el etanol es la fuente de carbono del cultivo, y nuevamente está proporción disminuye ligeramente cuando se añade sal.
- La expresión de la catalasa A presenta un perfil variegado dentro de la población. Existe una subpoblación de células que expresan la proteína en niveles elevados, y una población de células que no expresa la proteína.

REFERENCIAS

- Aebi, H. (1984). Oxygen radicals in biological systems: Preface. *Methods in Enzymology*, 186(1947), 121–126. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86091-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86091-9)
- Auesukaree, C. (2017). Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124(2), 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.03.009>
- Banat, I. M., Nigam, P., & Marchant, R. (1992). Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52 °C and producing ethanol at 45 °C and 50 °C. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 8(3), 259–263. <https://doi.org/10.1007/BF01201874>
- Banjara, N., Nickerson, K. W., Suhr, M. J., & Hallen-Adams, H. E. (2016). Killer toxin from several food-derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic *Candida* yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 222, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.016>
- Basiji, D. A., Ortyn, W. E., Liang, L., Venkatachalam, V., & Morrissey, P. (2007). Cellular Image Analysis and Imaging by Flow Cytometry. *Clin Lab Med*, 27(3), 653–viii. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.045>
- Basso, L., Basso, T., & Rocha, S. (2011). Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. En *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*. InTech. <https://doi.org/10.5772/17047>
- Beeler, E., & Singh, O. V. (2016). Extremophiles as sources of inorganic bio-nanoparticles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(9), 156. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2111-7>
- Billinton, N., & Knight, A. W. (2001). Seeing the Wood through the Trees: A Review of Techniques for Distinguishing Green Fluorescent Protein from Endogenous Autofluorescence. *Analytical Biochemistry*, 291(2), 175–197. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.5006>
- Bonugli-Santos, R. C., dos Santos Vasconcelos, M. R., Passarini, M. R. Z., Vieira, G. A. L., Lopes, V. C. P., Mainardi, P. H., Sette, L. D. (2015). Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. *Frontiers in Microbiology*, 6, 269. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00269>
- Bradford, M. M. (1976). Sistema séptico domiciliario | Rotomoldeo en Colombia Tanques Plasticos En Colombia Rotoplast. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Breuer, U., & Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* - An extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23(6), 415–437. <https://doi.org/10.1002/yea.1374>
- Buchmeier, N. A., Libby, S. J., Xu, Y., Loewen, P. C., Switala, J., & Guiney, D. (1995). DNA repair is more important than catalase for *Salmonella* virulence in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 95, 1047–1053. <https://doi.org/10.1172/JCI117750>
- Bumgarner, S. L. (2008). Mechanisms Underlying Cell-to-Cell Diversity in Clonal

- Populations of Yeast. Universidad de Michigan, Ann Harbor, MI.
- Bumgarner, S. L., Neuert, G., Voight, B. F., Symbor-Nagrabska, A., Grisafi, P., Van Oudenaarden, A., & Fink, G. R. (2012). Single-Cell Analysis Reveals that Noncoding RNAs Contribute to Clonal Heterogeneity by Modulating Transcription Factor Recruitment. *Molecular Cell*, 45(4), 470–482. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.11.029>
- Butinar, L., Santos, S., Spencer-Martins, I., Oren, A., & Gunde-Cimerman, N. (2005). Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters*, 244(2), 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.01.043>
- Carmen-Lisset, F., Cristina, R., Thomas, P., & Carlos, G. (2006). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts1. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 507–529. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00553.x>
- Castillo-Díaz, R. A. (2013). Expresión del gen *DhCTT1* de *Debaryomyces hansenii* en una mutante acatalasémica de *Saccharomyces cerevisiae*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cerulus, B., Jariani, A., Perez-Samper, G., Vermeersch, L., Pietsch, J. M., Crane, M. M., Verstrepen, K. J. (2018). Transition between fermentation and respiration determines history-dependent behavior in fluctuating carbon sources. *eLife Sciences*, (7), 1–33. <https://doi.org/10.7554/eLife.39234.001>
- Cherry, J. M., Adler, C., Ball, C., Chervitz, S. A., Dwight, S. S., Hester, E. T., Botstein, D. (1998). SGD: *Saccharomyces* Genome Database. *Nucleic acids research*, 26(1), 73–79. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9399804>
- Chung, W. H. (2017). Unraveling new functions of superoxide dismutase using yeast model system: Beyond its conventional role in superoxide radical scavenging. *Journal of Microbiology*, 55(6), 409–416. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6647-5>
- Confocal Microscopes - Institute for Molecular Bioscience - University of Queensland. (2018). Recuperado el 14 de enero de 2019, de <https://imb.uq.edu.au/facilities/microscopy/hardware-software/confocal-microscopes>
- D'Urso, A., Takahashi, Y. H., Xiong, B., Marone, J., Coukos, R., Randise-Hinchliff, C., Brickner, J. H. (2016). Set1/COMPASS and mediator are repurposed to promote epigenetic transcriptional memory. *eLife*, 5(JUN2016), 1–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.16691>
- Davies, D. (2015). Putting Down a Marker in Flow Cytometry to Help Determine Positivity. Recuperado de <https://bitesizebio.com/24573/putting-down-a-marker-in-flow-cytometry-to-help-determine-positivity/>
- de la Fuente-Colmenares, I. (2017). Análisis de la expresión de catalasas de *Debaryomyces hansenii* en *Saccharomyces cerevisiae*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- de la Torre-Ruiz, M., Pujol, N., & Sundaran, V. (2015). Coping With Oxidative Stress. The Yeast Model. *Current Drug Targets*, 16(1), 2–12. <https://doi.org/10.2174/1389450115666141020160105>
- Dohmen, R. J., Strasser, A. W. M., Höner, C. B., & Hollenberg, C. P. (1991). An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent

- cells of various yeast genera. *Yeast*, 7(7), 691–692. <https://doi.org/10.1002/yea.320070704>
- Dong, Q., Wang, Y., Qi, S., Gai, K., He, Q., & Wang, Y. (2018). Histone variant H2A.Z antagonizes the positive effect of the transcriptional activator CPC1 to regulate catalase-3 expression under normal and oxidative stress conditions. *Free Radical Biology and Medicine*, 121, 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.003>
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., Souciet, J. L. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature*, 430(6995), 35–44. <https://doi.org/10.1038/nature02579>
- Dujon, B. (2010). Yeast evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 11(7), 512–524. <https://doi.org/10.1038/nrg2811>
- Echeverrigaray, S., Randon, M., da Silva, K., Zacaria, J., & Delamare, A. P. L. (2013). Identification and characterization of non-*Saccharomyces* spoilage yeasts isolated from Brazilian wines. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(6), 1019–1027. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1265-9>
- Fia, G., Giovani, G., & Rosi, I. (2005). Study of β -glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 509–517. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02657.x>
- García-Campos, M. Á. (2014). Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*: Un análisis de la complementación heteróloga en una mutante acatalasémica de *Saccharomyces cerevisiae*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- García-González, A., & Ochoa, J. L. (1999). Anti-inflammatory activity of *Debaryomyces hansenii* Cu,Zn-SOD. *Archives of Medical Research*, 30(1), 69–73. [https://doi.org/10.1016/S0188-0128\(98\)00005-0](https://doi.org/10.1016/S0188-0128(98)00005-0)
- Halme, A., Bumgarner, S., Styles, C., & Fink, G. R. (2004). Genetic and Epigenetic Regulation of the FLO Gene Family Generates Cell-Surface Variation in Yeast antigen recognized by the host immune system (*Stringer and Keely, 2001*). In *Saccharomyces cerevisiae (FLO genes), proteins encoded by these genes confer adh. Cell* (Vol. 116). <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2804%2900118-7>
- Hernández-Saavedra, N. Y., & Ochoa, J. L. (1999). Copper-zinc superoxide dismutase from the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*, 15(8), 657–668. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19990615\)15:8<657::AID-YEA410>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19990615)15:8<657::AID-YEA410>3.0.CO;2-U)
- Hernández-Saavedra, N. Y., & Romero-Geraldo, R. (2001). Cloning and sequencing the genomic encoding region of copper-zinc superoxide dismutase enzyme from several marine strains of the genus *Debaryomyces* (Lodder & Kreger-van Rij). *Yeast*, 18(13), 1227–1238. <https://doi.org/10.1002/yea.768>
- Ikner, A., & Shiozaki, K. (2005). Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569(1–2), 13–27. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199772858.001.0001>
- Izawa, S., Inoue, Y., & Kimura, A. (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* (Vol. 320).

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1217898/pdf/8947468.pdf>
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., & Pretorius, I. S. (2006). The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 27(1), 15–39. <https://doi.org/10.21548/27-1-1475>
- Karpen, G. H., & Spradling, A. C. (1990). Reduced DNA polytenization of a minichromosome region. *Cell*, 63(1), 97–107.
- Klein, R. D., & Favreau, M. A. (1988). Transformation of *Schwanniomyces occidentalis* with an *ADE2* gene cloned from *S. occidentalis*. *Journal of bacteriology*, 170(12), 5572–5578. <https://doi.org/10.1128/jb.170.12.5572-5578.1988>
- Kojima, T., Karasawa, S., Miyawaki, A., Tsumuraya, T., & Fujii, I. (2011). Novel screening system for protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(4), 397–401. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.12.013>
- Krawczyk, Z. (1996). Sport as Symbol. *International Review for the Sociology of Sport*, 31(4), 429–436. <https://doi.org/10.1177/101269029603100405>
- Kurtzman, C. P., & Fell, J. W. (2006). Yeast Systematics and Phylogeny — Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology. En *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pp. 11–30). Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_2
- Lages, F., Silva-Graça, M., & Lucas, C. (1999). Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: A study of 42 species. *Microbiology*, 145(9), 2577–2585. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-9-2577>
- Legras, J. L., Merdinoglu, D., Cornuet, J. M., & Karst, F. (2007). Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology*, 16(10), 2091–2102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x>
- Lin, Z., & Li, W. H. (2011). Expansion of hexose transporter genes was associated with the evolution of aerobic fermentation in yeasts. *Molecular Biology and Evolution*, 28(1), 131–142. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq184>
- Lodder, D., Cons, K. R. N., Nakase, T., Suzuki, M., Phaff, H. J., & Kurtzman, C. P. (1992). 26. Debaryomyces Lodder & Kreger-van Rij Nom. Cons. T. Nakase, M. Suzuki, HJ. Phaff and C.P. Kurtzman. *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 17.
- Longo, V. D., Gralla, E. B., & Valentine, J. S. (1996). Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(21), 12275–12280. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.21.12275>
- López, G. (2015). Hetero-oligomerización de monómeros codificados por genes duplicados: LEU4 y LEU9, un caso específico. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Lushchak, V. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224(1), 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>
- Lushchak, V., Semchyshyn, H., Lushchak, O., & Mandryk, S. (2005). Diethyldithiocarbamate inhibits in vivo Cu,Zn-superoxide dismutase and perturbs free radical processes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells.

- Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(4), 1739–1744. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.147>
- Ma, M., & Eaton, J. W. (1992). Multicellular oxidant defense in unicellular organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(17), 7924–7928. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.17.7924>
- Martínez, J. L., Sychrova, H., & Ramos, J. (2011). Monovalent cations regulate expression and activity of the Hak1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(2), 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.06.013>
- Martins, D., & English, A. M. (2014). Catalase activity is stimulated by H₂O₂ in rich culture medium and is required for H₂O₂ resistance and adaptation in yeast. *Redox Biology*, 2, 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.019>
- Martorell, P., Ferna, M. T., & Querol, A. (2005). Sequence-based identification of species belonging to the genus *Debaryomyces*. *FEMS Yeast Research*, 5, 1157–1165. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2005.05.002>
- Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernández-Espinar, M. T., & Querol, A. (2007). Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2), 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.014>
- Membré, J.-M., Kubaczka, M., & Chéné, C. (1999). Combined Effects of pH and Sugar on Growth Rate of *Zygosaccharomyces rouxii*, a Bakery Product Spoilage Yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(11), 4921–4925. Recuperado de <https://aem.asm.org/content/65/11/4921.long>
- Migeon, B. R. (1994). X-chromosome inactivation: molecular mechanisms and genetic consequences. *Elsevier Science: TIG*, 10(7), 230–235. <https://doi.org/10.2337/diacare.22.4.649>
- Miller, I., Crawford, J., & Gianazza, E. (2006). Protein stains for proteomic applications: Which, when, why? *Proteomics*, 6(20), 5385–5408. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600323>
- Miranda, I., Silva, R., & Santos, M. A. S. (2006). Evolution of the genetic code in yeasts. *Yeast*, 23(3), 203–213. <https://doi.org/10.1002/yea.1350>
- Moradas-Ferreira, P., & Costa, V. (2000). Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox Report*, 5(5), 277–285. <https://doi.org/10.1179/135100000101535816>
- Musa, H., Kasim, F. H., Nagoor Gunny, A. A., & Gopinath, S. C. B. (2018). Salt-adapted moulds and yeasts: Potentials in industrial and environmental biotechnology. *Process Biochemistry*, 69(February), 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.03.026>
- Nakase, T., Suzuki, M., Takashima, M., Miyakawa, Y., Kagaya, K., Fukazawa, Y., & Komagata, K. (1994). *Candida sojae*, a new species of yeast isolated from an extraction process of water-soluble substances of defatted soybean flakes. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 40(2), 161–169. <https://doi.org/10.2323/jgam.40.161>
- Navarrete, C., Siles, A., Martínez, J. L., Calero, F., & Ramos, J. (2009). Oxidative stress sensitivity in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 9(4),

- 582–590. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00500.x>
- Nobre, M. F., & Costa, M. S. da. (1985). The accumulation of polyols by the yeast *Debaryomyces hansenii* in response to water stress. *Canadian Journal of Microbiology*, 31(11), 1061–1064. <https://doi.org/10.1139/m85-200>
- Noriega, D. (2012). Complementación heteróloga de una mutante acatalasémica de *Saccharomyces cerevisiae* con el gen de la catalasa A de *Debaryomyces hansenii*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Norkrans, B. (1966). Studies on marine occurring yeasts: Growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Archiv für Mikrobiologie*, 54(4), 374–392. <https://doi.org/10.1007/BF00406719>
- Ochoa, J., & Vázquez-Juárez, R. (2004). Las levaduras marinas como herramientas científica y biotecnológica. *Número Especial*, 39–50. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.09.144>
- Ochoa, L., & Latisnere-Barragán, H. (2006). Usos potenciales de las levaduras marinas de México. *Revista Ciencia, Academia Mexicana de Ciencias*.
- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1), 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3)
- Petersson, A., Almeida, J. R. M., Modig, T., Karhumaa, K., Hahn-Hägerdal, B., Gorwa-Grauslund, M. F., & Lidén, G. (2006). A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. *Yeast*, 23(6), 455–464. <https://doi.org/10.1002/yea.1370>
- Prista, C., Loureiro-Dias, M. C., Montiel, V., García, R., & Ramos, J. (2005). Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 5(8), 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.12.009>
- Prista, C., Michán, C., Miranda, I. M., & Ramos, J. (2016). The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast (Chichester, England)*, (33), 523–533. <https://doi.org/10.1002/yea.3177>
- Radecka, D., Mukherjee, V., Mateo, R. Q., Stojilkovic, M., Foulquié-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M. (2015). Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Research*, 15(6), fov053. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov053>
- Ricaurte, M. L., & Govind, N. S. (1999). Construction of plasmid vectors and transformation of the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. *Marine Biotechnology*, 1(1), 15–19. <https://doi.org/10.1007/PL00011745>
- Roelens, B., Clémot, M., Leroux-Coyau, M., Klapholz, B., & Dostatni, N. (2017a). Maintenance of heterochromatin by the large subunit of the CAF-1 replication-coupled histone chaperone requires its interaction with HP1a through a conserved motif. *Genetics*, 205(1), 125–137. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.190785>
- Roelens, B., Clémot, M., Leroux-Coyau, M., Klapholz, B., & Dostatni, N. (2017b). Maintenance of Heterochromatin by the Large Subunit of the CAF-1 Replication-Coupled Histone Chaperone Requires Its Interaction with HP1a Through a Conserved Motif. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.190785>
- Sabban, S. (2011). *Development of an in vitro model system for studying the*

- interaction of Equus caballus IgE with its high-affinity receptor FcεRI. Veterinary Immunology and Immunopathology.* <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.01.008>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Segal-Kischinevzky, C. (2011). *Las catalasas de Debaryomyces hansenii: Análisis de su expresión*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Segal-Kischinevzky, C., Rodarte-Murguía, B., Valdés-López, V., Mendoza-Hernández, G., González, A., & Alba-Lois, L. (2011). The euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii* has two catalase genes encoding enzymes with differential activity profile. *Current Microbiology*, 62(3), 933–943. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9806-z>
- Sheff, M. A., & Thorn, K. S. (2004). Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 21(8), 661–670. <https://doi.org/10.1002/yea.1130>
- Shin, K.-S., Hong, S.-D., & Bae, K. S. (1996). The significance of its-RFLPs and coenzyme Q system in determining taxonomic relationships among *Candida* species. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 42(6), 481–491. <https://doi.org/10.2323/jgam.42.481>
- Sicard, D., & Legras, J.-L. (2011). Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus Biologies*, 334(3), 229–236. <https://doi.org/10.1016/J.CRVI.2010.12.016>
- Sood, V., Cajigas, I., D'Urso, A., Light, W. H., & Brickner, J. H. (2017). Epigenetic transcriptional memory of GAL genes depends on growth in glucose and the tup1 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 206(4), 1895–1907. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.201632>
- Souciet, J.-L., Dujon, B., Gaillardin, C., Johnston, M., Baret, P. V., Cliften, P., Talla, E. (2009). Comparative genomics of protoploid *Saccharomycetaceae*. *Genome research*, 19(10), 1696–1709. <https://doi.org/10.1101/gr.091546.109>
- Stockholm, D., Benchaouir, R., Picot, J., Rameau, P., My, T., Neildez, A., Paldi, A. (2007). The Origin of Phenotypic Heterogeneity in a Clonal Cell Population In Vitro. *PLoS ONE*, (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000394>
- Stockwell, S. R., Landry, C. R., & Rifkin, S. A. (2015). The yeast galactose network as a quantitative model for cellular memory. *Molecular BioSystems*, 11(1), 28–37. <https://doi.org/10.1039/c4mb00448e>
- Stringer, J. R., & Keely, S. P. (2001). Genetics of surface antigen expression in *Pneumocystis carinii*. *Infection and Immunity*, 69(2), 627–639. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.627-639.2001>
- Taylor, M. P., Mulako, I., Tuffin, M., & Cowan, D. (2012). Understanding physiological responses to pre-treatment inhibitors in ethanologenic fermentations. *Biotechnology Journal*, 7(9), 1169–1181. <https://doi.org/10.1002/biot.201100335>
- Tokuoka, K., Ishitani, T., Goto, S., & Komagata, K. (1985). Identification of yeasts isolated from high-sugar foods. *Journal of Applied Microbiology*, 427(31), 411–427.
- Toledano, M. B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector, D., & Azevedo, D. (2003).

- Oxidative stress responses in yeast. En *Yeast Stress Responses* (pp. 241–303). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-45611-2_6
- Turk, M., Montiel, V., Žigon, D., Plemenitaš, A., & Ramos, J. (2007). Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. *Microbiology*, 153(10), 3586–3592. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/009563-0>
- Van der Walt, J. P., Taylor, M. B., & Liebenberg, N. V. D. W. (1977). Ploidy, ascus formation and recombination in *Torulasporea (Debaryomyces) hansenii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 43(2), 205–218. <https://doi.org/10.1007/BF00395675>
- Yajima, M., & Yokotsuka, K. (2001). Volatile compound formation in white wines fermented using immobilized and free yeast. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(3), 210–218. <https://doi.org/10.1002/jctb>