



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO EN EL LAPSO DE VIDA DE LA SOBREENPRESIÓN DEL GEN DE LA CATALASA T DE LA LEVADURA NO CONVENCIONAL *Debaryomyces hansenii* EN UNA CEPA ACATALASÉMICA DE *Saccharomyces cerevisiae*.**

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ROMÁN ALFONSO CASTILLO DÍAZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky**  
Facultad de Ciencias, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: Dra. Alicia González Manjarrez**  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM  
**Dr. Wilhelm Hansberg Torres**  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM



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.





# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO EN EL LAPSO DE VIDA DE LA SOBREENPRESIÓN DEL GEN DE LA CATALASA T DE LA LEVADURA NO CONVENCIONAL *Debaryomyces hansenii* EN UNA CEPA ACATALASÉMICA DE *Saccharomyces cerevisiae*.**

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ROMÁN ALFONSO CASTILLO DÍAZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky**  
Facultad de Ciencias, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: Dra. Alicia González Manjarrez**  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM  
**Dr. Wilhelm Hansberg Torres**  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

OFICIO FCIE/DAIP/0820/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de julio de 2019 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del alumno CASTILLO DÍAZ ROMÁN ALFONSO con número de cuenta 406056210 con la tesis titulada "EFECTO EN EL LAPSO DE VIDA DE LA SOBREEXPRESION DEL GEN DE LA CATALASA T DE LA LEVADURA NO CONVENCIONAL *Debaryomyces hansenii* EN UNA CEPA ACATALASEMICA DE *Saccharomyces cerevisiae*", realizada bajo la dirección de la DRA. CLAUDIA ANDREA SEGAL KISCHINEVZKY:

Presidente:	DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Vocal:	DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
Secretario:	DRA. MARÍA ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ
Suplente:	DR. JAMES ENRIQUE GONZÁLEZ FLORES
Suplente:	DRA. NURIA SÁNCHEZ PUIG

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 01 de octubre de 2019

  
DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA

AGNS/MMVA/ASR/ipp

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria  
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX  
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pbiol.posgrado.unam.mx/>

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por brindar la estructura necesaria para desarrollarme profesionalmente y en la adquisición de conocimientos.
- A CONACYT por la beca (con número CVU 545217) que fue indispensable para lograr concluir mis estudios de maestría
- A la Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky quien supo dar dirección e hizo un gran trabajo como tutora.
- A mi Comité Tutorial, integrado por la Dra. Alicia González Manjarrez y el Dr. Wilhelm Hansberg Torres, ya que a través de su guía se ha enriquecido el trabajo y mi formación profesional.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Agradezco a la doctora Claudia Segal y a los miembros del comité tutorial y sinodales por guiarme en el transcurso del desarrollo de este proyecto al igual que por su apoyo y su guía que han sido fundamentales para desarrollarme en la investigación.

A la Q. Viviana Escobar Sánchez por su apoyo Técnico del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica.

A la Dra. Edén Marcela Rodríguez Flores por su apoyo Técnico del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica

Agradezco a todos los colegas del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica que en cada momento propiciaron un ambiente de trabajo colaborativo y digno. Cada uno de ustedes tiene cualidades muy valiosas y ha sido un placer compartir el tiempo con cada uno de ustedes, estoy maravillado por la belleza y claridad que existe en su pensamiento.

## **DEDICATORIA**

A la UNAM y colegas.

A mi familia y amigos que me han acompañado a en cada proyecto que he iniciado.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
1.1 <i>Debaryomyces hansenii</i> .....	3
1.2 Envejecimiento por especies reactivas del oxígeno .....	4
1.3 Envejecimiento en levaduras .....	6
1.4 Especies reactivas del oxígeno, ERO .....	9
1.5 Generación de las ERO .....	11
1.6 Daños provocados por las ERO .....	13
1.7 Respuesta al estrés oxidante en <i>S. cerevisiae</i> .....	14
<b>2 HIPÓTESIS</b> .....	<b>17</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
3.1 General.....	17
3.2 Particulares .....	17
<b>4 MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
4.1 Cepas.....	18
4.2 Clonación del marco de lectura abierto del gen <i>DhCTT</i> en el vector de expresión <i>pYES2/CT</i> .....	18
4.3 Integración del gen de la catalasa T de <i>D. hansenii</i> en el locus <i>TRP1</i> de <i>S. cerevisiae</i> mediante recombinación homóloga .....	20
4.4 Ensayo de actividad específica de catalasa.....	21
4.5 Curvas de crecimiento .....	22
4.6 Ensayo de tolerancia a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	22



4.7	Curvas de viabilidad .....	22
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
5.1	Recombinación homóloga del gen <i>DhCTT</i> en el locus <i>TRP1</i> de <i>S. cerevisiae</i> .....	24
5.2	Construcción del vector de sobreexpresión del gen de la catalasa T de <i>D. hansenii</i> y verificación. ....	24
5.3	Actividad de catalasa.....	30
5.4	Curvas de crecimiento .....	31
5.5	Choque de peróxido de hidrógeno.....	31
5.6	Lapso de vida cronológico .....	34
<b>7</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>36</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>42</b>
<b>9</b>	<b>Anexo Protocolos.....</b>	<b>43</b>
9.1	Extracción de DNA genómico para levadura (PCI).....	43
9.2	Amplificación mediante PCR de alta fidelidad del gen <i>DhCTT</i> . ....	45
9.3	PCR para amplificar <i>DhCTT-TRP1</i> .....	46
9.4	Doble digestión de pYES2/CT con <i>HindIII</i> y <i>XhoI</i> .....	48
9.5	Purificación de la digestión de productos digeridos con <i>HindIII</i> y <i>XhoI</i> .....	49
9.6	Ligación de pYES2/CT con el amplicón <i>HindIII-DhCTT-XhoI</i> .....	50
9.7	Preparación de células quimiocompetentes de <i>E. coli</i> .....	52
9.8	Transformación de <i>E. coli</i> quimiocompetentes.....	53
9.9	PCR de colonia ( <i>E. coli</i> ).....	53
9.10	Protocolo de transformación de levadura .....	54
9.11	Medio de selección para mutantes <i>trp</i> .....	57
9.12	Obtención de extracto proteico .....	58
9.13	Ensayo de Bradford .....	59
9.14	Ensayo de actividad específica de catalasa.....	59

9.15	Curvas de crecimiento .....	60
9.16	Choque de peróxido de hidrógeno.....	61
9.17	Curvas de viabilidad .....	63
10	<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	64
12	<b>LITERATURA CITADA</b> .....	66

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Reducción secuencial univalente del oxígeno .....	10
Figura 2.	Reacciones en los sistemas biológicos que generan ERO .....	12
Figura 3.	Mapa del plásmido pYES2/CT .....	19
Figura 4.	Verificación de los sitios de restricción <i>HindIII</i> y <i>XhoI</i> en pYES2/CT .....	26
Figura 5.	Verificación de la clonación del amplicón <i>DhCTT</i> .....	27
Figura 6.	Liberación del amplicón <i>DhCTT</i> del plásmido pYES2/CT. ....	28
Figura 7.	Esquema del plásmido pYES2Gal <i>DhCTT</i> . ....	29
Figura 8.	Dinámica de crecimiento.....	31
Figura 9.	Lapso de vida cronológico.....	35
Figura 10.	Actividad específica de catalasa .....	37
Figura 11.	Equilibrio entre las ERO y la capacidad antioxidante .....	40

# 1 INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los cebadores para amplificar <i>DhCTT</i> .....	19
Tabla 2. Cebadores diseñados para integrar <i>DhCTT</i> mediante recombinación homóloga en el locus <i>TRP1</i> de la cepa acatalasémica de <i>S. cerevisiae</i> .....	21
Tabla 3. Calidad del DNA genómico extraído de <i>D. hansenii</i> .....	25
Tabla 4. Concentración de la purificación de pYES2/CT y amplicón <i>DhCTT</i> digeridos enzimáticamente .....	26
Tabla 5. Actividad específica de catalasa .....	30
Tabla 6 . Choque de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a células provenientes de medio SMM de la fase exponencial de crecimiento sin galactosa. ....	32
Tabla 7 . Choque de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a células provenientes de medio SMM de la fase exponencial de crecimiento con galactosa como inductor. ....	33
Tabla 8. Choque de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> hasta una concentración de 100 mM a células provenientes de medio SMM de la fase exponencial de crecimiento con galactosa como inductor.....	34
Tabla 9.: Preparación de la solución 1 .....	43
Tabla 10. Preparación de TE 10X.....	44
Tabla 11. Mezcla de PCR para amplificar <i>DhCTT</i> .....	45
Tabla 12. Programa para amplificar <i>DhCTT</i> en un termociclador.....	46
Tabla 13. Mezcla para la PCR de <i>DhCTT-TRP1</i> .....	48
Tabla 14. Master mix para una reacción de digestión de 50 µL: .....	49
Tabla 15. Mezcla para la ligación 1:3, 100 ng vector .....	51
Tabla 16. Mezcla para la ligación 1:5, 100 ng vector .....	52
Tabla 17. Preparación de solución TEL.....	55
Tabla 18. Preparación de solución TELP .....	56
Tabla 19. Composición del medio de selección 5-FAA .....	57
Tabla 20. Preparación de buffer de catalasas.....	58
Tabla 21.: Preparación de buffer de actividad de catalasa .....	60
Tabla 22. Preparación de los tubos para el reto de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> partiendo de una solución al 30% de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	62

## RESUMEN

El envejecimiento es un proceso multifactorial, algunos de estos factores son las especies reactivas del oxígeno (ERO). El oxígeno, que es indispensable para la síntesis de ATP en los organismos aerobios, provoca también daño a las biomoléculas y es en parte responsable del envejecimiento. Al estado celular resultante de un desequilibrio entre las moléculas capaces de prevenir la oxidación de otras moléculas (antioxidantes) y las ERO a favor de las últimas, se le denomina estrés oxidante. Debido a su importancia, los seres vivos poseen formas de detectar, determinar la concentración, mitigar y reparar los daños causados por las ERO. Las células mantienen dentro de parámetros fisiológicos los niveles de las ERO mediante diversos mecanismos, entre ellos las enzimas antioxidantes como la super óxido dismutasa, glutatión peroxidasa, tioredoxinas y la catalasa. La catalasa lleva a cabo la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua y es clave en el control de las ERO, ya que el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) puede bajo determinadas condiciones dar origen a especies muy reactivas como el radical hidroxilo, que provoca daños en las células como la lipoperoxidación, la modificación de purinas y pirimidinas y la ruptura de oligonucleótidos.

*Debaryomyces hansenii* es una levadura no convencional de gran interés para la biotecnología, una de sus cualidades es la alta tolerancia al  $H_2O_2$ . En trabajos previos realizados en el laboratorio, se determinó que la actividad de catalasa es mayor que la de *S. cerevisiae* bajo las mismas condiciones de cultivo. Debido a la carencia de estrategias metodológicas para el estudio de los genes y con el fin de analizar la tolerancia al  $H_2O_2$  de la catalasa de *D. hansenii*, se clonó el gen *DhCTT* de *D. hansenii* en el plásmido pYES2/CT bajo el control del promotor *GAL1*, esta construcción se transformó en una cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* y se realizaron curvas de viabilidad, ensayos de actividad de catalasa, curvas de crecimiento y ensayos de choque de peróxido en presencia y ausencia de galactosa como inductor.

La sobreexpresión del gen de la catalasa T de *D. hansenii* disminuyó el lapso de vida cronológico de la cepa acatalasémica de *S. cerevisiae*, posiblemente por la interrupción de cascadas de señales importantes para la extensión del lapso de vida cronológico; sin embargo, los ensayos de actividad específica de catalasa en presencia de galactosa mostraron una actividad 10 veces mayor en la cepa transformada al compararse con la cepa silvestre y la tolerancia a un choque por  $H_2O_2$  se incrementó cerca de 30 veces, resultando benéfica la sobreexpresión de la catalasa bajo estas condiciones.

## ABSTRACT

Aging is a multifactorial process, one of the main factors in the aging process are the free radicals, in particular the reactive oxygen species (ROS). Oxygen is essential for the ATP synthesis in aerobic organisms but is also responsible for damaging the biomolecules and is partly responsible for aging. The imbalance between the molecules capable of preventing the oxidation of other species (antioxidants) and reactive oxygen species in favor of the latter, results in oxidative stress.

Due to their importance, living beings have ways to detect, determine the concentration, mitigate and repair the ROS caused damage. Cells maintain ROS levels within normal parameters through various mechanisms, including antioxidant enzymes. Catalase, as one of the antioxidant enzymes, carries out the decomposition of hydrogen peroxide to oxygen and water, and it is key in the control of ROS, because hydrogen peroxide can give rise to reactive species, such as radical hydroxyl, that causes irreversible damage to cells under certain conditions.

*Debaryomyces hansenii* is a non-conventional yeast with great biotechnological potential, one of its qualities is the high tolerance to hydrogen peroxide. In previous work carried out in our laboratory, it was determined that catalase activity is greater than in *Saccharomyces cerevisiae*, and that this may explain this tolerance.

Due to the high tolerance of *D. hansenii* to hydrogen peroxide associated to the elevated catalase activity, we cloned the catalase T gene into the plasmid pYES2/CT under the control of the *GAL1* promoter. This construct was transformed in an acatalasemic strain of *S. cerevisiae*. Viability curves, catalase activity assay, growth curves, and survival assays after hydrogen peroxide shock in the presence and in the absence of galactose as inductor.

We found that the over-expression of *D. hansenii* catalase T decreased the chronological life span, probably due the disruption of signaling networks related with lifespan extension. On the other hand, the growth rate and the biomass reached is not affected. The tolerance to a hydrogen peroxide shock is greatly increased, as well as the catalase-specific activity in the presence of galactose, proving being beneficial under these conditions.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 *Debaryomyces hansenii*

*Debaryomyces hansenii* perteneciente a la familia Saccharomycetaceae y al clado CTG, -levaduras en las que el codón CTG puede ser ambigualmente traducido a serina o a leucina-, posee una mayor tolerancia a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que *Saccharomyces cerevisiae* (Segal-Kischinevzky et al., 2011), es halotolerante, posee un genoma redundante, es lipolítica y lipogénica, capaz de utilizar una gran variedad de fuentes de carbono y produce toxinas “killer” efectivas contra otras levaduras como especies de *Candida* (Breuer., 2006). Es por estas cualidades una levadura de gran interés para la ciencia básica y para la industria biotecnológica; sin embargo trabajar con este organismo presenta algunas limitaciones ya que las técnicas utilizadas en otras levaduras para realizar modificaciones genéticas no resultan efectivas posiblemente por las adaptaciones de la pared celular a las altas concentraciones de sales y porque no parece hacer recombinación homóloga (Prista et al., 2016). Existen grupos de investigación que afirman haber logrado modificar genéticamente a *D. hansenii*; sin embargo no han continuado los experimentos con las cepas generadas y no ha sido posible reproducir los resultados en otros laboratorios (Burke y Jennings, 1990; Minhas et al., 2009). Es por esta razón que mucho del trabajo realizado se ha hecho expresando heterológamente los genes de interés en levaduras para las cuales existen herramientas moleculares, como es el caso de la levadura *S. cerevisiae*, conocida también como la levadura del pan y es para la ciencia un organismo modelo de célula eucarionte que ha aportado información valiosa sobre el envejecimiento celular y el lapso de vida.

La tolerancia al  $H_2O_2$  de *D. hansenii* es mayor que la de *S. cerevisiae*, por esta razón es un modelo interesante en el contexto del estudio del envejecimiento por las ERO y de resistencia a las mismas. La tolerancia puede en parte explicarse por la actividad de la enzima catalasa que descompone  $H_2O_2$  en agua y oxígeno molecular. *D. hansenii* posee dos genes que codifican para catalasas, la catalasa A

(*DhCTA*) y la catalasa T (*DhCTT*), las cuales son homólogas a las de *S. cerevisiae*; sin embargo tienen un perfil de expresión distinto y en gran medida este depende de la fuente de carbono disponible (Segal-Kischinevzky et al., 2011). Debido a las dificultades en la manipulación genética de *D. hansenii* y a la incapacidad de construir mutantes con genes eliminados, resulta complejo determinar cuál de las dos enzimas es crucial para la tolerancia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Noriega en 2012 clonó en el plásmido pRS316 al gen de la catalasa A de *D. hansenii* y lo transformó en una mutante acatalasémica de *S. cerevisiae*, observando una mayor tasa de duplicación respecto a la cepa silvestre (Noriega, 2012). De manera similar, el gen de la catalasa T fue clonado en el plásmido pRS316 y se transformó en una cepa acatalasémica de *S. cerevisiae*, encontrándose como resultado que *S. cerevisiae* alcanzaba una mayor biomasa, posiblemente debido a la capacidad antioxidante de la catalasa T; sin embargo, estas últimas mutantes, transformadas con *DhCTT*, perdían la actividad de catalasa con el tiempo sin perder la capacidad de crecer en el medio de selección (Castillo, 2013).

## 1.2 Envejecimiento por especies reactivas del oxígeno

El periodo desde que un organismo inicia su vida hasta que muere se conoce como lapso de vida y a lo largo del lapso de vida, los organismos envejecen; el envejecimiento es la pérdida de la homeostasis fisiológica y el incremento en la probabilidad de morir debido a causas intrínsecas y extrínsecas. El proceso de envejecimiento no debe confundirse con la longevidad (Flatt, 2012). Generalmente el envejecimiento se maneja a nivel organísmico, cada órgano envejece a una tasa diferente, finalmente el componente individual es celular y por eso la gran importancia de comprender el envejecimiento en la célula. El lapso de vida y la tasa de envejecimiento es distinto de especie a especie y está determinado por factores extrínsecos e intrínsecos (Hamilton, 1966). Todos los organismos se encuentran en un sistema de recursos finitos y su manejo eficiente favorece la sobrevivencia, los recursos se reparten entre las distintas funciones de los organismos, esta es la idea sobre la cual se plantea la teoría del soma desechable, la cual explica que una línea

germinal se mantiene lo más protegida ante las carencias y agresiones ambientales mientras que las células somáticas son sacrificables y representan sólo un medio para alcanzar el éxito reproductivo (Kirkwood, 1992). Aunque esto parece sólo aplicar a organismos multicelulares, recientemente se observó que en organismos unicelulares se reparten de forma asimétrica los componentes viejos y deteriorados, quedándose en la célula madre (soma) la mayoría de los componentes dañados y los componentes nuevos en las células hijas (línea germinal). En el caso de las levaduras que se dividen por gemación, se ha descrito una maquinaria llamada polarisoma que se encarga de esta segregación de componentes, causando que la célula madre llegue a la senescencia (Floreza, 2017). Incluso en bacterias, cuya división es visualmente simétrica como en el caso de *E. coli*, se ha podido observar una repartición asimétrica de las biomoléculas dañadas; sin embargo a pesar de existir asimetría al repartir los componentes, se ha reportado que la célula madre no llega a morir a menos que se encuentre en condiciones de estrés y acumule daño exógeno (Rang et al. 2011), esta teoría es la más aceptada al día de hoy. Otra teoría que explica la longevidad es la conocida como la teoría de la hiperfunción, esta se fundamenta en parte de cada una de las teorías anteriores, pero propone que la continuación del programa genético que originalmente llevó al éxito reproductivo, es lo que finalmente provoca la falla en los organismos, limitando la longevidad al continuar sus funciones (hiperfunción) más allá de este periodo (Blagosklonny, 2012). En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha observado que el cese de la replicación y la entrada en la senescencia correlaciona con la hipertrofia de la célula madre, llegando a tener un tamaño hasta 10 veces más grande, lo que podría explicarse dentro de la teoría de la hiperfunción (Biliński et al., 2011).

El envejecimiento a nivel celular es un proceso multifactorial, entre algunos de los factores se consideran la formación de ERO, el acortamiento de los telómeros, la acumulación de desechos, fallas en los subsistemas (organelos) y fallas en la regulación genética (Song et al. 2018).



### 1.3 Envejecimiento en levaduras

En las levaduras se ha estudiado el envejecimiento a través de dos aproximaciones: determinando el número de células hijas que una célula madre pueda producir (lapso de vida replicativo) y en condiciones que limitan la división celular para posteriormente determinar si las células continúan viables después de un tiempo (lapso de vida cronológico). Ambos métodos asumen que el límite en la replicación y la pérdida de la viabilidad se deben al envejecimiento y no a otras causas, por eso es de gran importancia comprender que aunque *S. cerevisiae* es el organismo modelo eucarionte unicelular por excelencia, hay que tener cuidado al realizar extrapolaciones a otros organismos y al asumir que los fenómenos observados son causas directas del envejecimiento (Bilinski y Zadrag-Tecza, 2014). Por ejemplo, el acortamiento de los telómeros, que es un factor crucial para la entrada en la senescencia en organismos multicelulares, en el caso particular de las levaduras no ocurre de manera natural, ya que la telomerasa permanece activa durante todo el lapso de vida; sin embargo experimentos en levaduras en los que se inactiva artificialmente esta enzima, resultan en inestabilidad cromosómica después de 60 a 80 divisiones (Vershinin et al., 1995) ocasionando que las células pierdan la capacidad replicativa volviéndose senescentes, bajo estas condiciones la sobrevivencia es dependiente de la vía de señalización que responde al DNA dañado (Jay et al., 2016). Existen otras diferencias que se asocian a la senescencia replicativa en levaduras, por ejemplo la acumulación de pequeños círculos de rDNA extracromosomales, que se generan a partir de una ruptura de las dos cadenas de DNA y su posterior reparación mediante recombinación homóloga (Park et al., 1999), estos círculos se pueden acumular debido a la mitosis cerrada, que es una particularidad de solo algunos organismos y por eso mismo es un posible mecanismo de envejecimiento particular de organismos que poseen esta característica (Bilinski y Zadrag-Tecza, 2014). Por otro lado, se ha encontrado que la restricción calórica consistentemente incrementa el lapso de vida y retrasa la aparición del fenotipo asociado al envejecimiento desde levaduras hasta roedores a pesar de las diferencias fisiológicas entre especies. A nivel celular, la vía

conservada que responde a la limitación de nutrientes en común es TOR (por sus siglas en inglés *Target Of Rapamycin*). En levaduras hay dos proteínas, Tor1 y Tor2, las cuales tienen función de fosfatidil cinasas (Kaeberlein et al., 2005). Cuando los nutrientes son escasos (en las levaduras los experimentos de restricción calórica incluso se realizan en la ausencia total de nutrientes), la actividad de cinasa de las proteínas Tor disminuye, regulando distintas respuestas que culminan con un incremento en el lapso de vida. Estas respuestas varían de especie a especie, por ejemplo, se ha encontrado que en la mayoría de los organismos hay un incremento en los niveles de superóxido dismutasa y catalasa; sin embargo, no se observó un fenómeno similar en *Drosophila melanogaster*. Esto demuestra la utilidad de *S. cerevisiae* cuando se estudia el envejecimiento y la longevidad ya que existen mecanismos conservados a nivel celular entre distintas especies (Fontana et al., 2010).

Estudios a escala genómica en levadura, en los que se evaluó el efecto de más de 3,700 genes en el lapso de vida cronológico, han confirmado las dos vías que incrementan el lapso de vida ya conocidas, Tor/Sch9 y Ras/cAMP/PKA, las cuales responden a la disponibilidad de nutrientes regulando el ciclo celular y activando mecanismos de protección celular. También se encontraron genes implicados en la extensión o reducción del lapso de vida cronológico relacionados a procesos como la autofagia, la membrana mitocondrial, al ciclo celular, transcripción, etc. Cabe resaltar que encontraron un factor transcripcional, *Ste12*, que actúa de forma independiente a la vía TOR en las condiciones estudiadas (Campos et al. 2018; Kaeberlein et al., 2005). Adicionalmente en *S. cerevisiae* *Sir2* codifica una deacetilasa de histonas dependiente de NAD (Nicotinamida adenina dinucleótido) cuya sobreexpresión extiende el lapso de vida replicativo, sin embargo mutantes *Sir2Δ* presentan un lapso de vida cronológico extendido; es decir que genes que incrementan el lapso de vida replicativo pueden acortar el lapso de vida cronológico (Longo et al., 2012).

En *S. cerevisiae* la vía Tor/Sch9 es activada principalmente por aminoácidos, mientras que la vía Ras/cAMP/PKA está principalmente activada por glucosa; sin embargo otros nutrientes afectan estas cascadas de señales (Dechant y Peter, 2008; Fabrizio et al., 2001). Ambas vías extienden el lapso de vida cronológico cuando la concentración de nutrientes es limitada. Estas dos vías tienen puntos de convergencia, uno de es el regulón Rim15 que induce la transcripción de los factores de transcripción Msn2, Msn4 y Gis1, que ejercen efectos en el metabolismo, la utilización de nutrientes y la transcripción de genes asociados al estrés (Wei et al., 2008). Uno de los genes inducidos es el gen *CTT1* que codifica para la catalasa T citosólica de *S. cerevisiae* (Toledano et al., 2003).

En el contexto del envejecimiento por las ERO, en diversos organismos se ha observado que existe una relación respecto a la tasa metabólica y el envejecimiento: a mayor tasa metabólica mayor consumo de oxígeno y menor lapso de vida, junto con el fenotipo de envejecimiento (Molon et al., 2016). También se ha observado que al aumentar la tensión de oxígeno, se acorta el lapso de vida promedio y cuando se reduce la tensión de oxígeno, ocurre lo contrario dentro de ciertos límites (Bisschops et al., 2015; Nestelbacher et al., 2000). Experimentos proporcionando dietas con alto contenido de antioxidantes han dado como resultado el incremento en el lapso de vida promedio y retardado la aparición de enfermedades. Por otro lado, aunque en algunos experimentos los resultados se inclinan a favor de la teoría de envejecimiento por las ERO, experimentos similares no cambian ni reducen significativamente el lapso de vida o el envejecimiento. Esto en parte se puede deber a diferencias metodológicas, fondo genético variable, funciones alternativas de los antioxidantes empleados, etc. (Sadowska et al., 2014); sin embargo a pesar de que existan resultados contradictorios, no invalidan la teoría de envejecimiento por ERO, al contrario, señalan que el envejecimiento es multifactorial y en ciertas condiciones las ERO serían un factor más importante que en otros casos (Beckman y Ames, 1998).

## 1.4 Especies reactivas del oxígeno, ERO

Por su reactividad, el oxígeno en la atmósfera terrestre es para los organismos una oportunidad para obtener energía, pero de manera paralela esta reactividad se extiende a los componentes celulares pudiendo causarles daño; se trata de un beneficio que viene acoplado a un costo (Scandalios, 2002). Una de las teorías que pretende dar una explicación generalizada sobre las causas del envejecimiento y por lo tanto, a la longevidad, es la teoría del envejecimiento por las ERO, que establece que el envejecimiento se debe a la acumulación de daño en las biomoléculas y organelos causado por las ERO, ya que son capaces de dañar a todos los componentes celulares y en particular se ha estudiado ampliamente el daño al DNA, a las proteínas y a los lípidos. Esta teoría puede explicar fallas a nivel regulatorio, acumulación de desechos, fallas en enzimas cruciales y subsistemas que finalmente conducen al envejecimiento (Harman, 1956). Esta condición se ve agravada cuando existe un desequilibrio entre las ERO y los antioxidantes, desequilibrio que se define como estrés oxidante (Betteridge y Betteridge, 2000), siendo los antioxidantes las moléculas capaces de prevenir la oxidación de otras moléculas, ya sea inactivando los radicales libres o actuando como agentes quelantes de metales capaces de participar en reacciones redox, que dan origen a las ERO (Flora, 2014).

La reactividad de estas especies se debe a que poseen un electrón no apareado, por lo que tienden a reaccionar fácilmente para compensar el espín del electrón (Bayr, 2005). El oxígeno molecular posee dos electrones no apareados con el espín en el mismo sentido, por lo que no es una especie muy reactiva, pero cuando se excitan los electrones y uno cambia el sentido del espín se forma el singulete de oxígeno, que sí es reactivo (Figura 1). Cuando el oxígeno se reduce con un electrón se forma anión superóxido, que da origen a la mayoría de las especies reactivas en las células, si el anión superóxido se reduce con otro electrón se forma  $H_2O_2$ , éste en presencia de metales de transición da origen al radical hidroxilo, una especie

altamente reactiva capaz de reaccionar y dañar a los componentes celulares (Herrero et al., 2008).

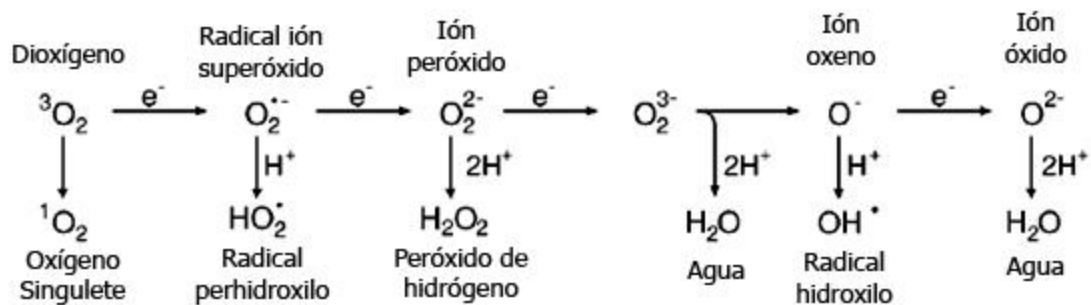


Figura 1. Reducción secuencial univalente del oxígeno (tomado de García, 2014)

## 1.5 Generación de las ERO

Las ERO se generan de diversas formas, por ejemplo, la radiación ionizante y la exposición a agentes químicos pueden dar lugar a éstas, pero en los organismos se generan principalmente como parte de procesos metabólicos involucrados en la respiración celular y reacciones en presencia de metales de transición (Rani et al., 2014).

La mitocondria, al ser el organelo en el que se lleva a cabo la respiración, juega un papel central en la teoría del envejecimiento por ERO. Las ERO se generan en la mitocondria en la cadena transportadora de electrones, cuando se fugan de la secuencia de los complejos aceptores y un sólo electrón reduce oxígeno, formando anión superóxido que a su vez dismuta de manera enzimática o espontánea, formando  $H_2O_2$ . En las levaduras no está presente el complejo I en la cadena transportadora, pero tiene dos NADH deshidrogenasas (Nde1 y Nde2) asociadas a la membrana mitocondrial interna y orientadas hacia el espacio intermembranal, que junto con el complejo III, son capaces de reducir al oxígeno con un sólo electrón y formar anión superóxido (Fang y Beattie, 2003).

Además, los peroxisomas son otra fuente de  $H_2O_2$  en levaduras, ya que también se genera durante la  $\beta$  oxidación de los ácidos grasos por la acil-CoA oxidasa. Otras enzimas del peroxisoma generan especies reactivas, como la alcohol oxidasa y la D-aminoácido oxidasa (Fang y Beattie, 2003; Herrero et al., 2008). Asimismo, en el retículo endoplásmico se generan durante el plegamiento oxidante al formar los enlaces disulfuro en las proteínas mediante su oxidación (Gross et al., 2006).

En presencia de  $Fe^{2+}$  y  $H_2O_2$  pueden ocurrir las reacciones de Fenton, que culminan en la producción del radical hidroxilo ( $OH\bullet$ ). Se discute la importancia de la fuente de ERO en los sistemas biológicos, ya que dependen de la concentración de hierro libre y la concentración de  $H_2O_2$  que por lo general es baja. Por otro lado existe el camino de Beckman-Radi-Freeman que genera  $OH\bullet$  en una serie de reacciones que

implican al anión superóxido ( $O_2^-$ ) y al óxido nítrico ( $\bullet NO$ ), que es una especie reactiva del nitrógeno (Radi et al., 2001). Entre las reacciones de Fenton y las de Beckman-Radi-Freeman se encuentra el atajo de Cadenas-Poderoso que conecta ambas vías a través de la ubiquinona (Figura 2).

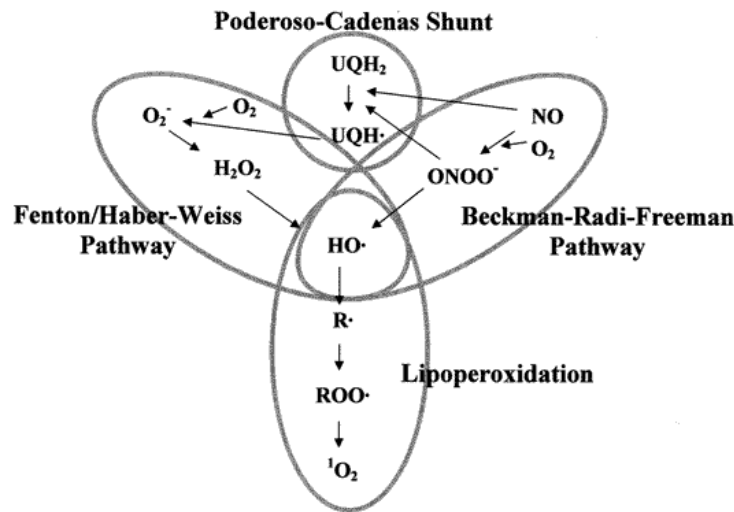


Figura 2. Reacciones en los sistemas biológicos que generan ERO; las reacciones de Fenton/Haber-Weiss y las reacciones de Beckman-Radi-Freeman generan radical hidroxilo. El atajo de Cadenas-Poderoso conecta ambas vías. También se muestra la generación de más radicales a través de la lipoperoxidación. NO (óxido nítrico),  $ONOO^-$  (peroxinitrito),  $HO^\bullet$  (radical hidroxilo),  $UQH_2$  (ubiquinol),  $UQH^\bullet$  (radical semiquinona),  $O_2^-$  (anión superóxido),  $O_2$  (oxígeno diatómico),  $R^\bullet$  (lípid radical),  $ROO^\bullet$  (lípid peroxil radical) (Valdez et al., 2000).

Las condiciones en las que la célula se encuentra favorecen o no la producción de las ERO, en general cualquier condición que comprometa la integridad de la membrana, particularmente la mitocondrial, la síntesis de proteínas y el agotamiento de los antioxidantes favorece un incremento en la producción de las ERO o su acumulación. Cuando las levaduras se encuentran en un ambiente sin nutrientes, utilizan las reservas energéticas como la trehalosa, glucógeno y los lípidos almacenados (Eleutherio et al., 2015). Cuando se agotan las reservas, la síntesis de proteínas se reduce, la producción de adenosín trifosfato (ATP por sus siglas en inglés) disminuye y la cadena transportadora de electrones permanece oxidada, la

integridad membranal se ve comprometida y se acumulan proteínas dañadas, todo esto conduce a la producción de ERO (Boender et al., 2011).

## 1.6 Daños provocados por las ERO

En lo referente a las proteínas, la cisteína, la metionina y la fenilalanina son aminoácidos particularmente sensibles a las ERO. Los grupos tiol de la cisteína se pueden oxidar de forma reversible y formar enlaces disulfuro o formar ácido sulfénico y de manera irreversible ácido sulfínico o ácido sulfónico (Klatt y Lamas, 2000). Las ERO son capaces de alterar la traducción del mRNA en presencia de cromo y en la mitocondria el  $H_2O_2$  es capaz de inactivar a varias de las enzimas del ciclo del ácido cítrico (Cabiscol et al., 2000).

Cuando se trata de daños al DNA, las principales ERO involucradas son el  $OH^\bullet$  y el singulete de oxígeno; esta última especie oxida a la guanina formando 8-oxoguanina, que es evidencia de daño al DNA generado por estrés oxidante. Las rupturas en el DNA de cadena sencilla o de doble cadena o, la formación de sitios abasídicos y la formación anormal de entrecruzamientos DNA-proteína son también conducidos por las ERO (Finn et al., 2012; Henle y Linn, 1997). Estos daños que comprometen la integridad y la funcionalidad del DNA están implicados en el envejecimiento y se pueden observar cuando se expone a *S. cerevisiae* a altas concentraciones de  $H_2O_2$  (Burhans y Weinberger, 2012; F. Madeo et al., 1999). *Saccharomyces cerevisiae* puede reparar este tipo de daños mediante distintos mecanismos y enzimas (Boiteux et al., 2013)

El daño que provocan las ERO a las membranas lipídicas de las levaduras generalmente es debido a lipoperoxidación, en la que un ácido graso insaturado es oxidado generalmente por el  $OH^\bullet$ , formando lipoperóxidos que generan una reacción en cadena que puede provocar graves daños a las membranas (Halliwell y Gutteridge, 2015). Es importante mencionar que las levaduras son incapaces de



sintetizar ácidos grasos insaturados, pero cuando se encuentran en el medio sí los incorporan a las membranas (Biliński et al., 1989).

### 1.7 Respuesta al estrés oxidante en *S. cerevisiae*

Los organismos poseen una gran cantidad de enzimas y moléculas antioxidantes que entran en acción antes de que existan daños a las biomoléculas. A pesar de la existencia de los antioxidantes, algunas ERO llegan a dañar a los componentes celulares, que son resueltos por mecanismos de reparación. Como fue mencionado previamente, en *Saccharomyces cerevisiae* uno de los daños más comunes al DNA es provocado por la reacción de las ERO con la base nitrogenada guanina, produciendo 8-oxoguanina, la enzima 8-oxoguanina glicosilasa escinde las bases afectadas dando inicio al proceso de reparación por escisión de nucleótidos (Boiteaux et al., 2002). En otros casos el daño no puede ser reparado, pero se pueden reciclar las moléculas, esto es común en el caso de las proteínas y por último, hay casos en que las biomoléculas dañadas no pueden ni repararse ni reciclarse y se acumulan con el paso del tiempo (Dunlop et al., 2009).

La respuesta al estrés oxidante comienza con la detección de niveles superiores a los fisiológicos que desata una respuesta adaptativa. En *S. cerevisiae* el factor de transcripción Yap1 (*yes associated protein 1*) interactúa con la caja YRE (*Yap1 Recognition Element*) en la región promotora de genes implicados en la respuesta celular al estrés oxidante (Fernandes et al., 1997). El factor Yap1 posee en el carboxilo terminal un dominio de exportación nuclear rico en cisteína al cual se encuentra unido la proteína Crm1p que dirige la importación en condiciones de normoxia (21% de O<sub>2</sub>) de Yap1 al citosol, en estas condiciones el dominio rico en cisteína permanece reducido; sin embargo cuando hay un incremento en las ERO, principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la región rica en cisteína del dominio de exportación nuclear de Yap1 se oxida, disociándose de Crm1p, lo que causa la translocación al núcleo en el que estimula la transcripción de genes de respuesta a estrés oxidante; es importante mencionar que Yap1 no es oxidada directamente por las ERO, la

oxidación es mediada por una proteína similar a la glutatión peroxidasa llamada Gpx3p/Orp1, que posee cisteínas sensibles a la oxidación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> las cuales se oxidan formando cisteína-ácido sulfénico, que reacciona con el dominio rico en cisteína de Yap1, permitiendo la formación de enlaces disulfuro intramoleculares en Yap1 (Delaunay et al., 2000).

También se encuentra el factor Skn7, que regula la biosíntesis de la pared celular, el ciclo celular, la respuesta a estrés osmótico y al estrés oxidante, este factor en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> interactúa con las secuencias HSE (*Heat Shock Elements*) (Delaunay et al., 2000; Raitt et al., 2000). Yap1 y Skn7 estimulan la transcripción de genes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa T, tiorredoxinas y proteínas de choque térmico (*HSP*) (Lee et al., 1999). Por último los factores Msn2 y Msn4 mencionados previamente, interactúan con elementos STRE (*Stress Response Element*) que son importantes en la respuesta al estrés oxidante, la hipersalinidad, al estrés por calor, en el cambio diáuxico, en la recuperación del estrés y en el reciclaje y eliminación de moléculas dañadas irreversiblemente (Hasan et al., 2002).

Otras respuestas que incluyen la autofagia, la ubiquitinación de las proteínas para su degradación en el proteosoma y la mitofagia, son procesos importantes en la determinación del lapso de vida y sobrevivencia bajo estrés oxidante (Farrugia y Balzan, 2012). Por último, cuando la exposición a concentraciones dañinas es súbita o se prolonga demasiado, las defensas antioxidantes no son suficientes y se inicia la muerte celular programada. En presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la apoptosis es dirigida por una metacaspasa, la eliminación del gen que la codifica (*MCA1*) previene este evento por completo (Madeo et al., 2009).

De las enzimas antioxidantes inducidas por los factores de transcripción mencionados previamente, SOD y la catalasa son centrales en la prevención de la formación de las ERO más nocivas; la primera genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir de anión superóxido y la segunda genera agua a partir del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de hecho, la principal fuente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los sistemas biológicos se genera enzimáticamente por la acción de la

SOD. Estas dos enzimas son de gran importancia al lidiar con el estrés generado por las ERO, la falta de actividad de catalasa se conoce como acatalasemia y se consideró por mucho tiempo como asintomática; sin embargo recientemente se relacionó con una mayor incidencia de diabetes mellitus (Góth et al. 2015).

Tanto *S. cerevisiae* como *D. hansenii* poseen 2 catalasas, la catalasa A que se ubica en el peroxisoma (no se ha demostrado en la levadura eurihalina) y la catalasa T que es citosólica; ambas catalasas son monofuncionales y tienen al grupo hemo en su sitio activo, su masa es menor a los 60 KDa por lo que se agrupan como catalasas de subunidades pequeñas, son homotetrámeros y los monómeros no son funcionales (Hansberg et al., 2012). Todas las catalasas monofuncionales con grupo hemo llevan a cabo la degradación del  $H_2O_2$  en dos pasos. En el primero una molécula de  $H_2O_2$  oxida al grupo hemo y se forma un grupo oxiferrilo, un equivalente de oxidación proviene del hierro y el otro de la porfirina (compuesto I) y se genera la primera molécula de  $H_2O$  (reacción 1); en el segundo paso una segunda molécula de  $H_2O_2$  reduce el compuesto I, devolviendo a la catalasa a su estado inicial y produciendo una segunda molécula de agua y oxígeno molecular (reacción 2) (Chelikani et al., 2004).

El objetivo de este proyecto es lograr expresar la catalasa T de *D. hansenii* en una cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* y estudiar los efectos que tiene en el lapso de vida cronológico, la tolerancia al  $H_2O_2$  exógeno, seguir la dinámica de crecimiento y determinar la actividad específica de catalasa en el contexto de la teoría del envejecimiento por ERO.

## 2 HIPÓTESIS

La expresión heteróloga del gen *DhCTT* de la levadura *D. hansenii* en una cepa acatalasémica de *S. cerevisiae*, prevendrá la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la consecuente formación de ERO capaces de dañar los componentes celulares, logrando así extender el lapso de vida cronológico.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 General

- Estudiar el efecto que tiene la expresión del gen *DhCTT* en el lapso de vida cronológico de una cepa acatalasémica de *S. cerevisiae*.

### 3.2 Particulares

- Integrar en el locus *TRP1* el gen de la catalasa T mediante recombinación homóloga y selección con ácido 5 fluoroantranílico.
- Clonar en el vector de expresión pYES2/CT el gen *DhCTT* que codifica para la catalasa T de *D. hansenii*.
- Evaluar el efecto en el crecimiento de la cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* que expresa *DhCTT*.
- Determinar la tolerancia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* que expresa *DhCTT*.
- Medir la actividad específica de catalasa de la cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* que expresa *DhCTT*.

## 4 MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 Cepas

Se utilizaron las cepas *Debaryomyces hansenii* Y7426 y una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* acatalasémica y una silvestre provenientes de la cruce de las cepas parentales Y13615 (BY4742; MAT $\alpha$ ; ura3 $\Delta$ 0; leu2 $\Delta$ 0; his3 $\Delta$ 1; lys2 $\Delta$ 0; YDR256c::kanMX4) y Y04718 (BY4741; MAT $\alpha$ ; ura3 $\Delta$ 0; leu2 $\Delta$ 0; his3 $\Delta$ 1; met15 $\Delta$ 0; YGR088w::kanMX4) ambas de la colección de mutantes de Euroscarf, con el genotipo resultante para la acatalasémica (ura3 $\Delta$ 0; leu2 $\Delta$ 0; his3 $\Delta$ 1; lys2 $\Delta$ 0; YDR256c::kanMX4; YGR088w::kanMX) y para la silvestre (ura3 $\Delta$ 0; leu2 $\Delta$ 0; his3 $\Delta$ 1; lys2 $\Delta$ 0).

La propagación de los plásmidos se llevó a cabo en *Escherichia coli* XL1-Blue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr)]).

### 4.2 Clonación del marco de lectura abierto del gen *DhCTT* en el vector de expresión *pYES2/CT*

El gen de la catalasa T de *D. hansenii* se amplificó mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) utilizando el estuche *Phusion Flash High Fidelity Master Mix* de *Thermo Scientific* y los cebadores *DhCTTOHindIII Fw* y *DhCTTOXhoIRv* (Tabla 1) a partir de DNA genómico de *D. hansenii* extraído con fenol:cloroformo:isoamílico (PCI). El producto resultante de la PCR consistió en el marco de lectura abierto del gen *DhCTT* flanqueado por los sitios de restricción para *HindIII* en el extremo 5' y *XhoI* en el extremo 3', a este se le llamó amplicón *DhCTT*. Se verificó el tamaño del amplicón mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed.

Tabla 1. Características de los cebadores para amplificar DhCTT

Nombre	Secuencia	Número de bases (pb)	Porcentaje de GC
<i>DhCTTOHindIII</i> Fw	GCGCGCAAGCTTATGGTTTCTGAATACATTCAAATAC	38	38.4
<i>DhCTTOXhoI</i> Rv	GCGCGCCTCGAGTTAGTTAGCAGGAGCTATTCC	33	57.5

El vector *pYES2/CT* fue donado por la doctora Nuria Sánchez Puig, del Instituto de Química de la UNAM, campus CU. El vector *pYES2/CT* está diseñado para propagarse en *E. coli* y para expresarse en *S. cerevisiae*, el sitio de clonación múltiple cuenta con los sitios de restricción para las enzimas *HindIII* y *XhoI*, el DNA clonado queda bajo el control del promotor *GAL1* el cual es inducible en presencia de galactosa y se reprime en presencia de glucosa, es un plásmido multicopia y posee el gen de selección *URA3* (Figura 3). Se verificó el tamaño del plásmido mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed.

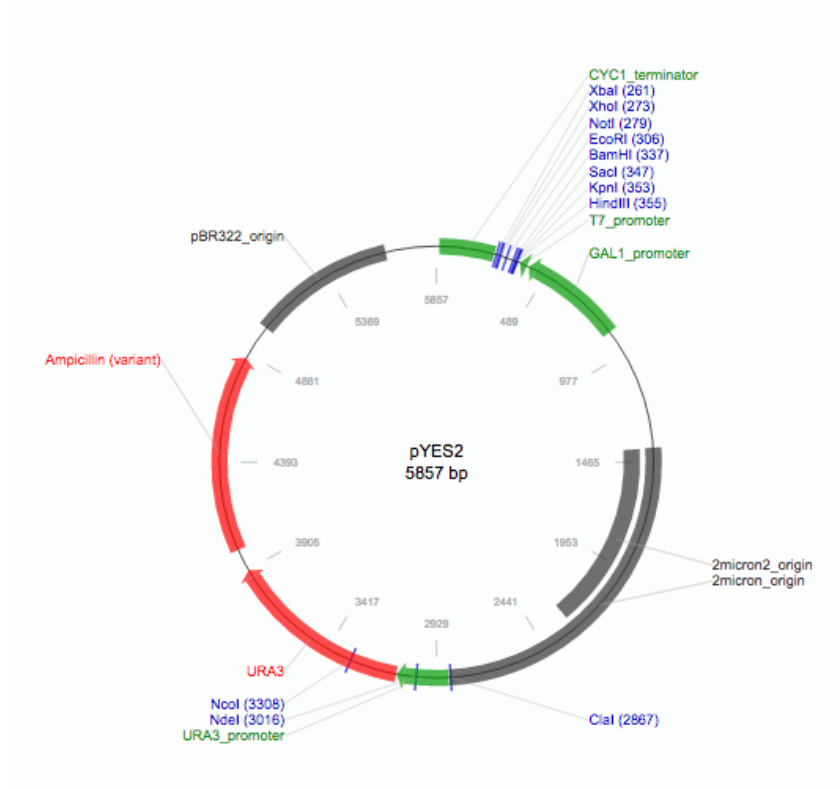


Figura 3. Mapa del plásmido *pYES2/CT*

Tanto el plásmido *pYES2/CT* como el amplicón *DhCTT* fueron digeridos por las enzimas de restricción *HindIII* y *XhoI* del fabricante *Thermo Fisher Scientific* siguiendo las instrucciones provistas. Una vez digeridos, los productos fueron purificados utilizando el estuche comercial *QIAquick PCR purification* siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se procedió a la ligación, la cual se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante con el estuche *T4 DNA ligation* de *Thermo Fischer Scientific*. El producto de la ligación fue transformado en células quimicompetentes de *E. coli XL1Blue* y las transformantes fueron seleccionadas en caldo de lisogenia (por sus siglas en inglés LB y compuesto por triptona 1%, NaCl 1% y Extracto de levadura 0.5%) adicionado con ampicilina a una concentración de 200 µg/mL. A las colonias capaces de crecer en el medio de selección se les analizó mediante PCR de colonia con el fin de confirmar la integración del marco de lectura del gen *DhCTT* en el plásmido *pYES2/CT*. Se verificó el tamaño del nuevo plásmido llamado *pYES2GalDhCTT* mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed.

El plásmido *pYES2GalDhCTT* se transformó en la cepa acatalasémica y el plásmido *pYES2/CT* en las cepas de *S. cerevisiae* acatalasémica y silvestre para que todas tuvieran complementada la auxotrofia de uracilo. Las transformantes fueron seleccionadas en medio mínimo suplementado (SMM) sin uracilo.

### 4.3 Integración del gen de la catalasa T de *D. hansenii* en el locus *TRP1* de *S. cerevisiae* mediante recombinación homóloga

A partir de DNA genómico de *D. hansenii* extraído mediante PCI, se amplificó mediante la PCR el marco de lectura abierto (por sus siglas en inglés ORF) del gen *DhCTT* junto con mil pares de bases río arriba del ORF para abarcar la región promotora y 300 pares de bases río abajo del ORF para abarcar la región 3' no traducida. Los cebadores utilizados fueron *DhCTT1F-TRP1* y *DhCTT1R-TRP1* los cuales añaden al amplicón en el extremo 5' y en el 3' 50 pares de bases idénticos a la región que flanquea al gen *TRP1* en el genoma de *S. cerevisiae* (Tabla 2). A la cepa acatalasémica se le sometió al protocolo de recombinación homóloga y se

seleccionaron las recombinantes en medio con ácido 5 fluoroantranílico (5-FAA), las colonias recombinantes deben ser auxótrofas para triptófano ya que el gen *TRP1* es sustituido por el producto del amplicón. El principio de selección del 5-FAA se basa en la transformación del 5-FAA a 5 fluorotriptófano, el cual es tóxico y sólo lo pueden llevar a cabo cepas con la vía biosintética del triptófano completa.

*Tabla 2. Cebadores diseñados para integrar DhCTT mediante recombinación homóloga en el locus TRP1 de la cepa acatalasémica de S. cerevisiae.*

Nombre	Secuencia	Número de bases (pb)
<i>DhCTT1F-TRP1</i>	AAAAGAAAAGGAGAGGGCCAAGAGGGAGGGCATTGGTGAC TATTGAGCACGTATTACTGCCACTGCATTGAG	72
<i>DhCTT1R-TRP1</i>	ATTTTATGTTTAGATCTTTTATGCTTGCTTTTCAAAGGCCTG CAGGCAACGAATGGTGAAGTCACTACTGTG	71

#### 4.4 Ensayo de actividad específica de catalasa

El ensayo se llevó a cabo siguiendo la descomposición del peróxido de hidrógeno a 240 nm (Aebi, 1983) por la actividad de la catalasa de extractos proteicos de cultivos de la fase exponencial de crecimiento, provenientes de medio SMM con rafinosa como fuente de carbono y en SMM con rafinosa como fuente de carbono y galactosa como inductor del promotor *GAL1* incubados a 28°C /180 revoluciones por minuto (rpm). La concentración de proteína de los extractos fue cuantificada con el protocolo *Bio-Rad Protein Assay* y siguiendo las instrucciones del fabricante. El cálculo de la actividad de catalasa se llevó a cabo con la siguiente fórmula:

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

Donde:

AEC = actividad específica de catalasa



m= pendiente / minuto

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (  $43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  )

Volumen de la reacción en  $\mu\text{L}$  = 3 mL = 3000  $\mu\text{L}$

## 4.5 Curvas de crecimiento

Se siguió la densidad óptica a 600 nm de longitud de onda ( $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ ) de cultivos inoculados a una  $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$  inicial de 0.05 durante 72 horas en medio SMM con rafinosa como fuente de carbono y de SMM con rafinosa como fuente de carbono y galactosa incubadas a  $28^\circ\text{C}$  / 180 rpm.

## 4.6 Ensayo de tolerancia a $\text{H}_2\text{O}_2$

Se realizó con células de cultivos de la fase exponencial de crecimiento, provenientes de medio SMM con rafinosa como fuente de carbono y en SMM con rafinosa como fuente de carbono y galactosa como inductor del promotor *GAL1* incubados a  $28^\circ\text{C}$  /180 rpm, las células fueron transferidas a tunos de ensayo con medio SMM fresco adicionados con concentraciones desde 0 a 100mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y se incubaron durante tres horas a  $28^\circ\text{C}$  a 180 rpm, una vez transcurridas las tres horas, las células se lavaron dos veces con agua bidestilada estéril y se hicieron diluciones seriales en base 10 desde  $10^0$  hasta  $10^{-3}$ , de cada una de las diluciones y concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se colocó una gota de 10 $\mu\text{L}$  en una caja de Petri de 10 cm de diámetro de medio rico YPD agar (extracto de levadura 1%, peptona 2% , dextrosa 2% y agar 2%) y se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  durante 72 horas. Se documentó la tolerancia mediante fotografías de la densidad de colonias en cada gota.

## 4.7 Curvas de viabilidad

Células provenientes de cultivos de la fase exponencial de crecimiento, provenientes de medio SMM con rafinosa como fuente de carbono y de SMM con

rafinosa como fuente de carbono y galactosa incubadas a 28°C / 180 rpm fueron lavadas dos veces con agua bidestilada y se inoculó un matraz con 100 mL de agua bidestilada estéril a una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.05. El matraz fue incubado a 28°C a 180 rpm durante 30 días. Para analizar la viabilidad a lo largo de los 30 días se tomaron varias alícuotas de los cultivos y se diluyeron a un factor de 10<sup>-3</sup>, de esta dilución se tomaron 300µL y se repartieron en cajas de medio rico YPD con la ayuda de 6 perlas de vidrio estériles. Las cajas se incubaron durante 72 horas a 28°C y se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Recombinación homóloga del gen *DhCTT* en el locus *TRP1* de *S. cerevisiae*

Se probó la sensibilidad al agente de selección 5-FAA de las cepas acatalasémica de *S. cerevisiae* y la cepa silvestre, ambas presentaron sensibilidad al 5-FAA y no hubo crecimiento en el medio de selección. El 5-FAA contra selecciona cepas capaces de sintetizar triptófano; es decir sólo las mutantes incapaces de sintetizar triptófano crecen en medio sin 5-FAA.

Se amplificó exitosamente mediante PCR el gen de la catalasa T de *D. hansenii* añadiendo las regiones que flanquean al gen *TRP1* de *S. cerevisiae* con ayuda de los cebadores *DhCTT1F-TRP1* y *DhCTT1R-TRP1*; sin embargo el amplicón *DhCTT-TRP1* no se pudo integrar al locus *TRP1* mediante recombinación homóloga, las colonias capaces de crecer en medio de selección con 5-FAA, también fueron capaces de crecer en medio de cultivo sin triptófano, se analizaron más de 900 colonias y todas eran capaces de crecer sin triptófano, posteriormente se analizó mediante PCR la integración del gen *DhCTT* en el locus de algunas de las colonias, pero no se produjo ningún amplicón. Por este motivo se decidió clonar al gen de la catalasa T de *D. hansenii* en el plásmido pYES2/CT, poniéndolo bajo el control del promotor inducible *GAL1* de *S. cerevisiae* y transformarlo en la cepa acatalasémica.

### 5.2 Construcción del vector de sobreexpresión del gen de la catalasa T de *D. hansenii* y verificación.

Se realizó la extracción del DNA genómico (gDNA) de *D. hansenii* con el objetivo de amplificar el gen de la catalasa T. La concentración y la pureza del gDNA obtenido cumplió los requerimientos para amplificar mediante PCR de alta fidelidad el gen *DhCTT* (Tabla 3).

Tabla 3. Calidad del DNA genómico extraído de *D. hansenii*

Muestra	Concentración (ng/μL)	Absorbancia a 260nm	Absorbancia a 280nm	Relación 260/280
<i>D. hansenii</i> gDNA1	20.5	0.41	0.22	1.90
<i>D. hansenii</i> gDNA2	26	0.53	0.28	1.91
<i>D. hansenii</i> gDNA3	22.5	0.45	0.23	1.91

Utilizando el gDNA de *D. hansenii* se logró amplificar el gen *DhCTT* mediante PCR de alta fidelidad con la polimerasa *Phusion Flash* de *Thermo Scientific*. El amplicón obtenido (*DhCTT*) abarca desde el ATG inicial hasta el codón de paro de la traducción, el producto tiene 1.674 Kb y los cebadores añaden la secuencia reconocida por la enzima de restricción *HindIII* en el extremo 5' y *XhoI* en el extremo 3'.

El plásmido pYES2/CT en la levadura *S. cerevisiae* es de alto número de copia ya que contiene un origen de replicación de 2μ, el sitio de clonación múltiple está precedido por el promotor *GAL1*, este promotor es inducible en presencia de galactosa (inductor), mientras que la glucosa lo reprime aun en presencia de galactosa, mientras que la rafinosa mantiene al promotor listo para ser inducido en presencia de galactosa, por este motivo se utiliza rafinosa en los medios de cultivo en lugar de glucosa; el amplicón *DhCTT* fue clonado exitosamente en el sitio de clonación múltiple del plásmido pYES2/CT el cual queda río abajo del promotor *GAL1* y bajo su control. Para seleccionar a las levaduras transformadas, el plásmido pYES2/CT contiene el gen de selección *URA3* que restaura la auxotrofia de uracilo en las cepas utilizadas en esta tesis, adicionalmente posee el gen de resistencia a la ampicilina y un origen de replicación para *E. coli*.

El plásmido pYES2/CT fue digerido con las enzimas *HindIII* y *XhoI* de manera independiente, con el fin de verificar la presencia de los sitios de restricción y confirmar que se trataba del plásmido de 5,856 pares de bases (Figura 1).

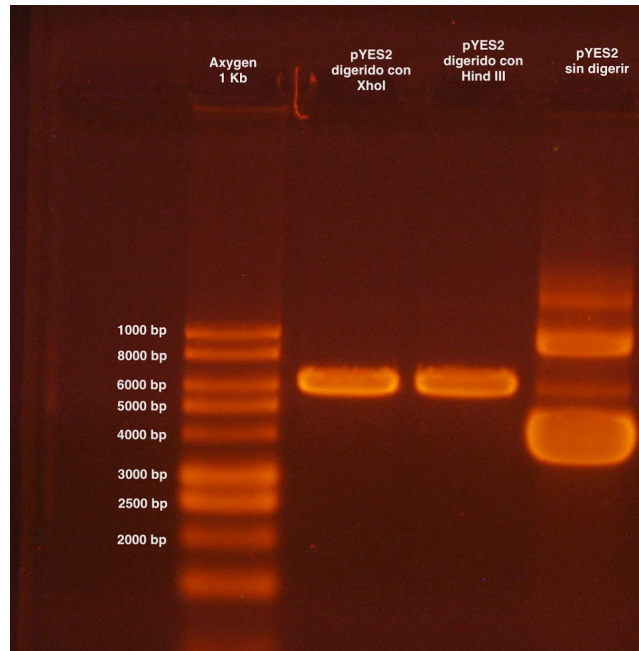


Figura 4. Verificación de los sitios de restricción *HindIII* y *XhoI* en *pYES2/CT*. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con *GelRed*; de izquierda a derecha, marcador de peso molecular *Axygen 1Kb*, *pYES2/CT* digerido con *XhoI*, *pYES2/CT* digerido con *HindIII*, *pYES2/CT* sin digerir.

Tanto el plásmido *pYES2/CT* como el amplicón *DhCTT* fueron digeridos en dos reacciones independientes utilizando simultáneamente las enzimas *HindIII* y *XhoI*. Posteriormente se purificaron ambos productos y se determinó la pureza y concentración como paso previo a la ligación (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración de la purificación de *pYES2/CT* y amplicón *DhCTT* digeridos enzimáticamente

Muestra	Digerido con	Concentración después de la purificación ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia 260 nm	Absorbancia 280 nm	Relación 260/280
PCR <i>DhCTT</i>	<i>HindIII</i> y <i>XhoI</i>	18.20	0.4	0.2	1.68
<i>pYES2/CT</i>	<i>HindIII</i> y <i>XhoI</i>	27.10	0.5	0.3	1.83

El producto de la ligación se transformó en cepas quimiocompetentes de *E. coli* (XL1 Blue) y se seleccionó en medio LB sólido con ampicilina ( $200 \mu\text{g/mL}$ ), las colonias resultantes se analizaron mediante PCR de colonia para verificar la clonación del amplicón *DhCTT* en el vector *pYES2/CT* (Figura 5).

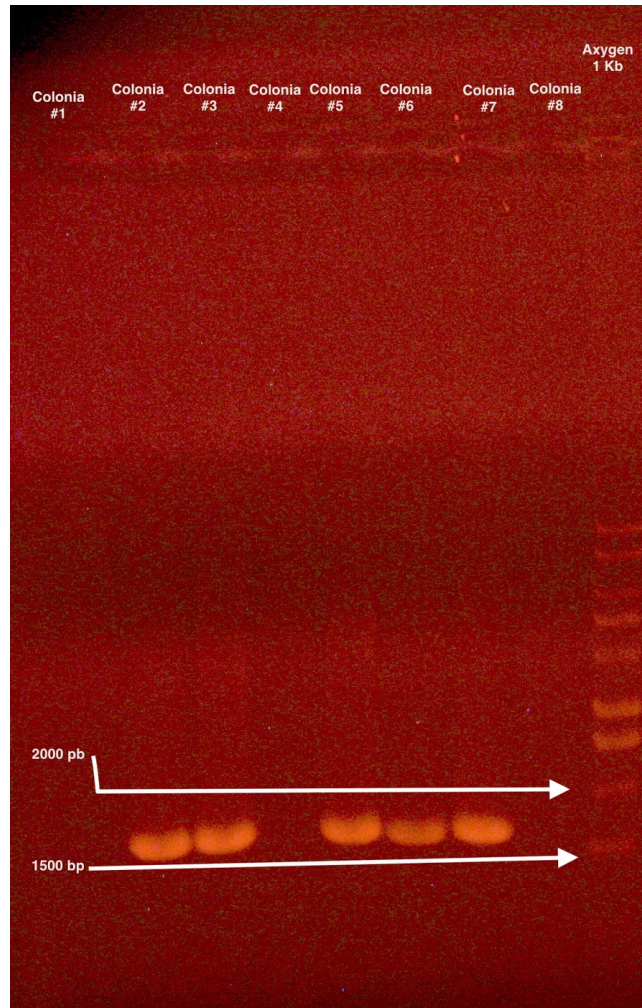
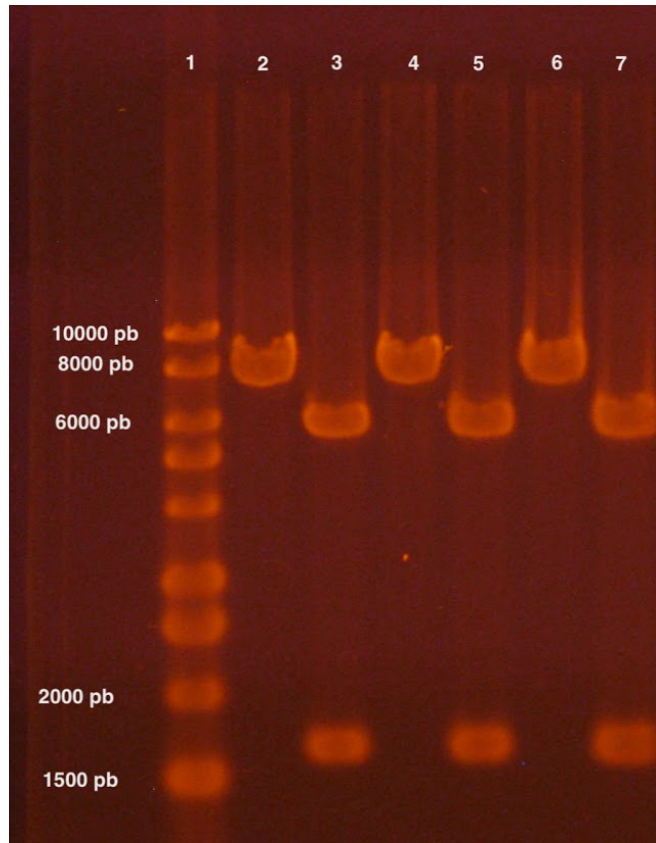


Figura 5. Verificación de la clonación del amplicón *DhCTT* en el plásmido *pYES/CT* mediante PCR de colonia de las colonias transformantes de *E. coli*. Gel de agarosa al 1%, teñido con GelRed; en las colonias 2, 3, 5, 6, y 7 se encontró al amplicón con las características esperadas; las colonias 1, 4 y 8 no presentaron ningún amplicón.

A partir del PCR de colonia se seleccionaron las colonias de *E. coli* en las que se logró amplificar el gen *DhCTT*, estas fueron aisladas y cultivadas con el fin de propagar el plásmido *pYES2GALDhCTT* y se realizó una minipreparación. Se confirmó nuevamente a partir de las minipreparaciones que el amplicón con el gen *DhCTT* se encontrara en el plásmido *pYES2/CT* mediante la liberación del inserto digiriendo simultáneamente con las enzimas *XhoI* y *HindIII* (Figura 6).



*Figura 6. Liberación del amplicón DhCTT del plásmido pYES2/CT. Gel de agarosa al 1%, teñido con GelRed.; carril 1, marcador de peso molecular Axygen 1 Kb Plus; carriles 2, 4 y 6, digestión con HindIII de las minipreparaciones realizadas a las E. coli que resultaron positivas en el PCR de colonia, como se esperaba, el plásmido linealizado se encuentra cercano a las 8 Kp; carriles 3, 5 y 7 digestión con HindIII y XhoI de las minipreparaciones realizadas a las E. coli que resultaron positivas en el PCR de colonia, se puede observar la liberación del amplicón DhCTT entre las bandas de 2 Kb y 1.5 Kb del marcador de peso molecular, coincidiendo con la masa molecular esperada.*

El plásmido resultante fue nombrado *pYES2GalDhCTT* (Figura 7), éste se transformó en la cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* y el plásmido pYES2/CT sin inserto se transformó en la cepa silvestre y en la acatalasémica para complementar la auxotrofia de uracilo (vector vacío); la selección se llevó a cabo en medio mínimo suplementado (SMM) sin uracilo.

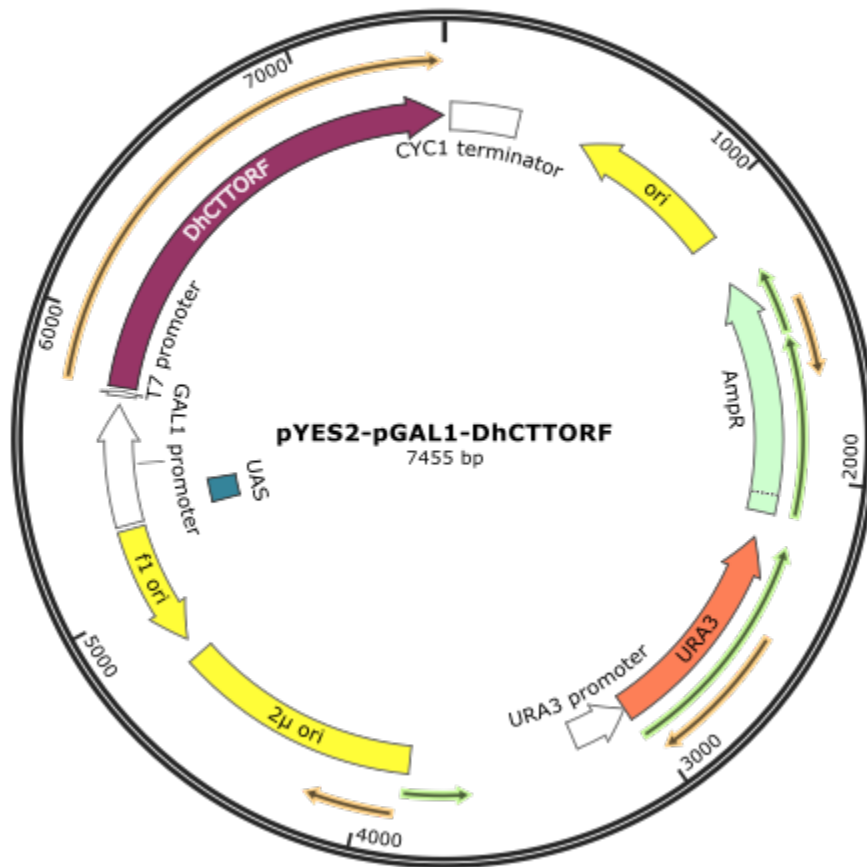


Figura 7. Esquema del plásmido pYES2GalDhCTT. El marco de lectura abierto del gen DhCTT (DhCTTORF) queda bajo el control del promotor inducible en presencia de galactosa GAL1, el plásmido es multicopia y posee el gen de selección URA3 que complementa la auxotrofia de uracilo.



### 5.3 Actividad de catalasa

Una vez transformada la cepa acatalasémica con el plásmido pYES2Gal*DhCTT* y las cepas silvestre y acatalasémica con el vector sin inserto, se obtuvo un extracto proteico de la fase exponencial de crecimiento (1-2 D.O.<sub>600nm</sub>) en medio SMM con rafinosa y SMM con rafinosa y galactosa de cada cepa, se determinó la concentración de proteína total y junto con el ensayo de actividad de catalasa se determinó la actividad específica de catalasa (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad específica de catalasa

Cepa	μmol de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> oxidados/minuto * μg de proteína	
	SMM Raf	SMM Raf+Gal
Acat::pYES2/CT	-	-
WT::pYES2/CT	2.89 (± 0.02)	7.5 (± 0.92)
Acat::pYES2Gal <i>DhCTT</i>	50.1 (± 0.18)	470 (± 6.21)

La cepa acatalasémica transformada con pYES2*DhCTT* expresa el gen de la catalasa T de *Debaryomyces hansenii* y presenta mayor actividad específica de catalasa que la cepa silvestre *S. cerevisiae* transformada con el plásmido pYES2/CT sin inserto; la cepa acatalasémica transformada con pYES2/CT no presenta actividad de catalasa.

## 5.4 Curvas de crecimiento

Se evaluó el crecimiento de las cepas del experimento en medio mínimo suplementado (SMM) con y sin inductor, todas las cepas crecieron de forma similar en presencia y en ausencia del inductor (Figura 8).

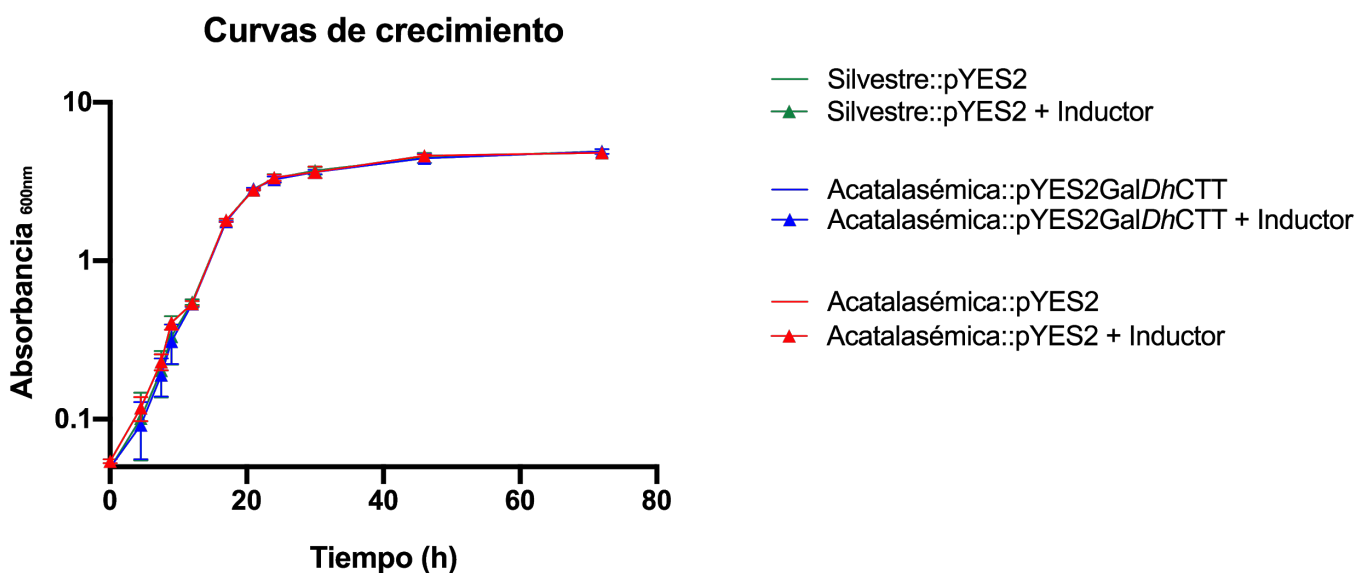


Figura 8. Dinámica de crecimiento en medio SMM con o sin galactosa; la cepa silvestre (verde) crece de la misma manera que la cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* (rojo) y que la cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* que sobreexpresa el plásmido pYES2 (azul) independientemente de la presencia o ausencia de galactosa (inductor).

## 5.5 Choque de peróxido de hidrógeno

Con la finalidad de evaluar si la cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* que sobreexpresa la catalasa T de *D. hansenii* posee una mayor tolerancia a  $H_2O_2$ , células que provenían de la fase exponencial de crecimiento en medio de cultivo SMM con o sin galactosa como inductor, fueron expuestas durante tres horas a un choque con concentraciones desde 0 a 100 mM de  $H_2O_2$  y después se plaquearon diluciones seriales en cajas de YPD que se incubaron por 72 horas. Sin inductor la cepa silvestre de *S. cerevisiae* fue la que presentó la mayor tolerancia, seguida por

la cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* que sobreexpresa la catalasa T de *D. hansenii* y por último la cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* es la que tuvo menor tolerancia (Tabla 6). Cuando el cultivo se llevó a cabo en presencia del inductor, la cepa acatalasémica fue la que tuvo menor tolerancia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, incluso menor que en ausencia del inductor. Entre la cepa silvestre y la cepa acatalasémica que sobreexpresa la catalasa T de *D. hansenii* no se observaron diferencias en la tolerancia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el rango de concentración que va de 0 a 20 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabla 7), pero cuando se evaluó la tolerancia en concentraciones mayores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, desde 40 a 100 mM, la cepa que sobreexpresa la catalasa T de *D. hansenii* toleró hasta 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que la cepa silvestre con dificultades creció en una concentración de 60 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabla 8).

Tabla 6 . Choque de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a células provenientes de medio SMM de la fase exponencial de crecimiento sin galactosa.

		RAFINOSA				
		[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]				
	Dilución	0 mM	2.5 mM	5 mM	10 mM	20 mM
<b>Wt::pYES2</b>	10 <sup>0</sup>					
	10 <sup>-1</sup>					
	10 <sup>-2</sup>					
	10 <sup>-3</sup>					
<b>Acatalasémica::pYES2</b>	10 <sup>0</sup>					
	10 <sup>-1</sup>					
	10 <sup>-2</sup>					
	10 <sup>-3</sup>					
<b>Acatalasémica::pYES2GalDhCTT</b>	10 <sup>0</sup>					
	10 <sup>-1</sup>					
	10 <sup>-2</sup>					
	10 <sup>-3</sup>					

Tabla 7 . Choque de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a células provenientes de medio SMM de la fase exponencial de crecimiento con galactosa como inductor.

	<b>RAFINOSA + INDUCTOR</b>					
	<b>[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]</b>					
	<b>Dilución</b>	<b>0 mM</b>	<b>2.5 mM</b>	<b>5 mM</b>	<b>10 mM</b>	<b>20 mM</b>
<b>Wt::pYES2</b>	<b>10<sup>0</sup></b>					
	<b>10<sup>-1</sup></b>					
	<b>10<sup>-2</sup></b>					
	<b>10<sup>-3</sup></b>					
<b>Acatasémica::pYES2</b>	<b>10<sup>0</sup></b>					
	<b>10<sup>-1</sup></b>					
	<b>10<sup>-2</sup></b>					
	<b>10<sup>-3</sup></b>					
<b>Acatasémica::pYES2GalDhCTT</b>	<b>10<sup>0</sup></b>					
	<b>10<sup>-1</sup></b>					
	<b>10<sup>-2</sup></b>					
	<b>10<sup>-3</sup></b>					

Tabla 8. Choque de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta una concentración de 100 mM a células provenientes de medio SMM de la fase exponencial de crecimiento con galactosa como inductor.

		RAFINOSA + INDUCTOR				
		[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]				
	Dilución	0 mM	40 mM	60 mM	80 mM	100 mM
Wt::pYES2	10 <sup>0</sup>					
	10 <sup>-1</sup>					
	10 <sup>-2</sup>					
	10 <sup>-3</sup>					
Acatasémica::pYES2GalDhCTT	10 <sup>0</sup>					
	10 <sup>-1</sup>					
	10 <sup>-2</sup>					
	10 <sup>-3</sup>					

## 5.6 Lapso de vida cronológico

Para conocer de qué manera afecta la sobreexpresión de la catalasa T en el lapso de vida cronológico, se transfirieron cultivos de las cepas utilizadas en el experimento provenientes de la fase exponencial de crecimiento de medio de cultivo SMM con y sin galactosa a agua para que no se dividieran las células y se monitoreó la viabilidad a lo largo de 30 días, tomando el día 0 como el 100% de la viabilidad (Figura 9). La galactosa induce la expresión del gen *DhCTT* en el plásmido pYES2GalDhCTT

El 50% de las células del cultivo de la cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* permaneció viable al día 6; cuando las células habían crecido en presencia del inductor, el 50% de las células permaneció viable al día 16. En el caso del cultivo de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* en ausencia del inductor, hubo un 50% de

viabilidad alrededor del día 18, cuando se añadió inductor, 50% de las células fueron viables al día 28, incrementando considerablemente los días que permanecen viables. La cepa de *S. cerevisiae* que sobreexpresa la catalasa T de *D. hansenii* mantuvo el 50% de la viabilidad sin el inductor alrededor del día 18, cuando habían crecido inductor, 50% del cultivo se mantuvo viable al día 20.

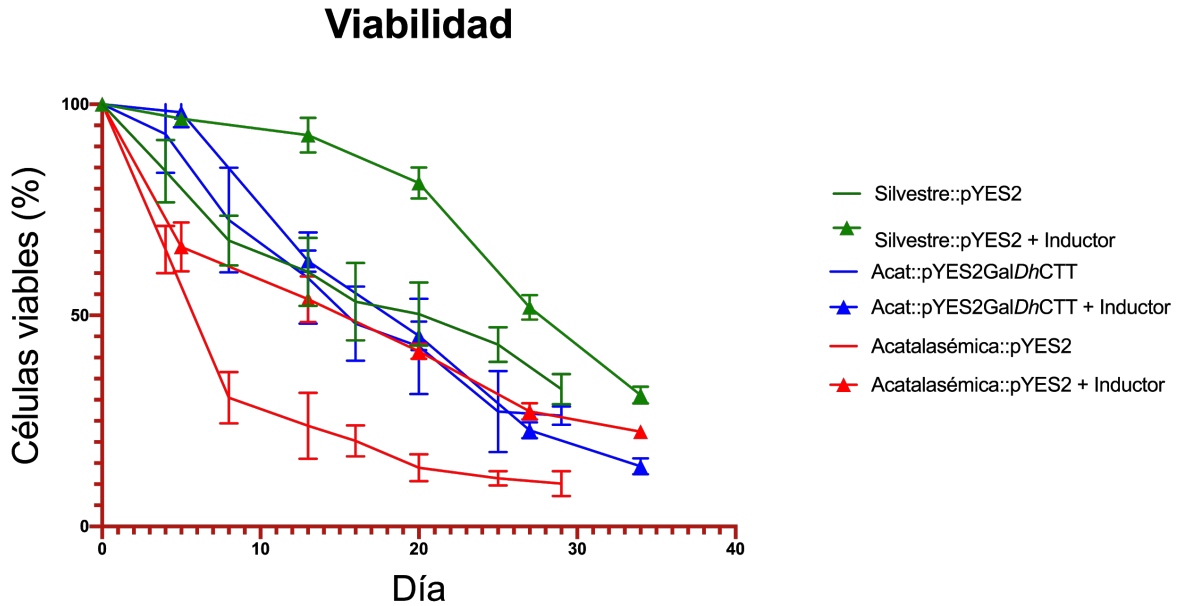


Figura 9. Lapso de vida cronológico de células provenientes de medio SMM de la fase exponencial de crecimiento y transferidas a agua; la cepa silvestre y la cepa acatalasémica extendieron el lapso de vida cuando provenían de cultivos con galactosa, este efecto no se observa en la cepa acatalasémica transformada con pYES2GalDhCTT.

## 7 DISCUSIÓN

La intención del proyecto era obtener una cepa de *S. cerevisiae* que expresara de manera heteróloga al gen que codifica a la catalasa T de *D. hansenii*. Una primera aproximación para generar esta mutante, fue tratar de insertar el gen *DhCTT* en la región del genoma de la cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* que corresponde al gen *TRP1*, utilizando ácido 5-FAA. Sin embargo, esta metodología resultó en un gran número de colonias, aparentemente recombinantes, que eran en realidad falsos positivos ya que eran capaces de crecer en ausencia de triptófano. Analizando este fenómeno en retrospectiva, pensamos que si se incrementara el número de pares de bases con identidad a la región flanqueante del gen *TRP1* que se añaden a los cebadores que generan el amplicón para transformación y se incrementara la concentración de ácido 5-FAA al momento de seleccionar las colonias que han recombinado, se podrían obtener buenos resultados utilizando esta estrategia. Sin embargo y de manera alternativa, se consiguió la expresión heteróloga del gen *DhCTT* que codifica para la catalasa T de *D. hansenii*, transformando a la cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* con el plásmido pYES2gal*DhCTT*. Existen diferencias entre el vector de expresión pYES2/CT y la recombinación homóloga ya que debido a que el vector pYES2/CT es multicopia y el promotor *GAL1* es inducible por galactosa, la dosis génica en las cepas modificadas es más elevada en las cepas con el plásmido que en las recombinantes, así como la diferencias entre promotores.

Al evaluar la actividad específica de catalasa de cultivos provenientes de fase exponencial de crecimiento con inductor presente se observó que tanto la cepa silvestre transformada con pYES2/CT como la cepa acatalasémica transformada con pYES2Gal*DhCTT*, exhiben mayor actividad respecto al cultivo sin inductor, 2.5 y 10 veces más respectivamente (Figura 10). Esto se puede explicar en parte por la dosis génica que presenta la cepa acatalasémica transformada con pYES2Gal*DhCTT*, ya que el plásmido posee una secuencia de replicación de  $2\mu$  y podrían haber de 40 a 60 copias en el núcleo (Chan, et al., 2013); para obtener una

idea de la importancia de la dosis génica en la actividad específica de catalasa, se puede dividir la actividad específica ( $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2$  oxidado por minuto por  $\mu\text{g}$  de proteína) de la cepa transformada con pYES2GalDhCTT entre el número de copias del plásmido (40 - 60), resultando que sin inductor cambiaría de 5.1 a un valor de alrededor de 0.12 y con inductor de 47.05 a un valor de 1.1, lo que implicaría que el fenómeno de tolerancia se debe en gran parte al número de copias del plásmido que incrementa la dosis génica.

### Actividad específica de catalasa

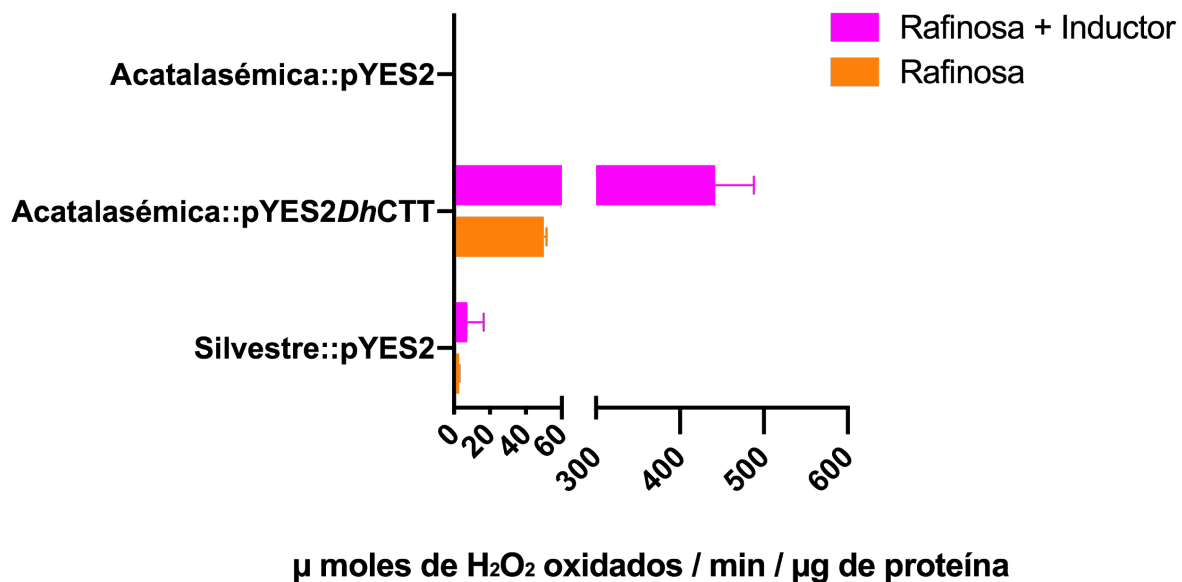


Figura 10. Actividad específica de catalasa

Las curvas de crecimiento en medio SMM con y sin inductor son iguales para la cepa de *S. cerevisiae* silvestre, la cepa de *S. cerevisiae* acatalasémica y la cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* transformada con pYES2GalDhCTT; la sobreexpresión del gen DhCTT y una alta actividad específica de catalasa no que altera el crecimiento, tampoco la falta de la enzima tiene un papel determinante en el crecimiento. Esto puede deberse a que existen otras enzimas como la glutatión peroxidasa capaces de descomponer el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y/o también a que la  $K_m$  de las catalasas se encuentra en el orden de mili moles (Switala y Loewen, 2002), teniendo



poca afinidad por el sustrato a bajas concentraciones; es posible que durante el crecimiento en SMM con y sin inductor la concentración de  $H_2O_2$  esté por debajo de la  $K_m$  de la catalasa T de *D. hansenii*. Este fenómeno ha sido observado con anterioridad en medio rico con glucosa en *S. cerevisiae*: la delección de uno o ambos genes que codifican para las catalasas (A o T) no modificó el crecimiento (Izawa, et al., 1996).

Nuestra hipótesis, de acuerdo a la teoría del envejecimiento por radicales libres, era que al sobreexpresar la catalasa T de *D. hansenii* en una cepa acatalasémica de *S. cerevisiae*, se protegería a la cepa de las especies reactivas generadas durante el periodo sin nutrientes y tendría un lapso de vida cronológico mayor; sin embargo al estudiar el lapso de vida cronológico encontramos que agregar galactosa al medio (inductor) se incrementa el lapso de vida cronológico tanto para la cepa silvestre como para la cepa acatalasémica, pero no se observó este efecto cuando se sobreexpresó la catalasa T de *D. hansenii* en una cepa acatalasémica de *S. cerevisiae*, lo que sugiere que ya sea la sobreexpresión de la catalasa o bien su alta actividad, impiden esta respuesta. El  $H_2O_2$  actúa como segundo mensajero en las células y cuando la concentración intracelular no excede un límite que no resulte tóxico pero sea suficientemente elevado, puede desencadenar mecanismos que extienden el lapso de vida cronológico; esta extensión puede estar mediada por los factores de transcripción Yap1, Skn7, Msn2, Msn4 y Gis1 que estimulan la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de los azúcares, lípidos, autofagia, ciclo celular, respuesta a estrés general, sobrevivencia en la fase estacionaria, etc. (Mohammad et al., 2018). La sobreexpresión de la catalasa T de *D. hansenii* en la cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* podría mantener los niveles de  $H_2O_2$  debajo de las concentraciones que inducen los mecanismos que culminan en una extensión del lapso de vida cronológico, explicando las diferencias que se observan entre las distintas cepas. Es importante notar que la cepa de *S. cerevisiae* acatalasémica tiene un lapso de vida menor respecto a la cepa silvestre en cualquiera de las condiciones de cultivo, lo que sugiere que la catalasa es

importante en el lapso de vida cronológico y que no basta sobreexpresarla para incrementarlo, como se observa en la cepa transformada con pYES2GalDhCTT.

En la naturaleza, *S. cerevisiae* se encuentra en ambientes en los que hay más de una fuente de carbono, algunas son consideradas óptimas ya que permiten alcanzar mayor biomasa en menor tiempo. El paradigma en cuanto a la utilización de las fuentes de carbono es que primero se utilizan las fuentes de carbono óptimas y una vez que se agotan se comienzan a utilizar las otras fuentes de carbono, a este cambio de fuente de carbono se le conoce como cambio diáuxico (Siegal, 2015). La galactosa, que no es una fuente de carbono óptima, o bien la mezcla de galactosa y rafinosa, podría ser en la naturaleza un evento que anticipe la falta de nutrientes y ser la señal que provoque que *S. cerevisiae* se adapte de manera anticipada y tenga un lapso de vida cronológico extendido. Por otro lado, la galactosa podría generar efectos horméticos si el estrés que genera es moderado. Es posible tener este efecto positivo en el lapso de vida cronológico, ya que es un azúcar reductor a diferencia de la rafinosa; los azúcares reductores pueden reaccionar con los grupos amino libres y formar bases de Schiff, que pueden desencadenar la formación de ERO. Asimismo, la acción de *GRE3*, que codifica para una aldosa reductasa, podría producir galactitol a partir de la galactosa, que al acumularse genera estrés osmótico y desencadena la respuesta general al estrés. Adicionalmente, algunos hongos poseen la enzima galactosa oxidasa que produce  $H_2O_2$  (Bo-Htay et al., 2018).

Cuando evaluamos la tolerancia de las cepas exponiéndolas a un choque de  $H_2O_2$  durante 30 minutos, la sobreexpresión de la catalasa favorece la sobrevivencia. La cepa de *S. cerevisiae* que sobreexpresa la catalasa T de *D. hansenii* presenta la mayor sobrevivencia, logrando resistir hasta 100 mM de  $H_2O_2$ , mientras que la cepa acatalasémica es la menos tolerante y la tolerancia disminuye aún más cuando se agrega el inductor. Estos resultados ponen en evidencia la importancia de la catalasa en la sobrevivencia a una fuente exógena de  $H_2O_2$ .

En este trabajo pudimos observar en los distintos experimentos que la sobreexpresión de la catalasa T de *D. hansenii* en una cepa acatalasémica de *S.*

*cerevisiae*, no afectó el crecimiento en medio SMM, evitó una extensión del lapso de vida cronológico en presencia de la galactosa e incrementó mucho la tolerancia a una fuente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> externa, resultando en un efecto neutro, negativo y positivo respectivamente en los experimentos mencionados previamente. La cepa transformada con pYES2GalDhCTT, al no tener una regulación de la catalasa T de *D. hansenii* que se relacione directamente con las condiciones ambientales, queda en una gran desventaja, respecto a la cepa silvestre, que responde a las condiciones ambientales de manera adecuada.

La capacidad de regular los sistemas antioxidantes y la generación de las ERO de acuerdo a las condiciones ambientales y procesos celulares es indispensable para tener una buena adecuación y llevar a cabo los procesos fisiológicos de la célula de manera normal. Un exceso de ERO daña a las células de manera irreversible, causando la pérdida de la viabilidad de forma anticipada; sin embargo, son necesarias para iniciar respuestas que culminan en la adaptación de las células al estrés. Por otro lado, un exceso de antioxidantes puede causar la disrupción de vías de señalización y alterar tanto las funciones fisiológicas normales como la longevidad (Figura 11).

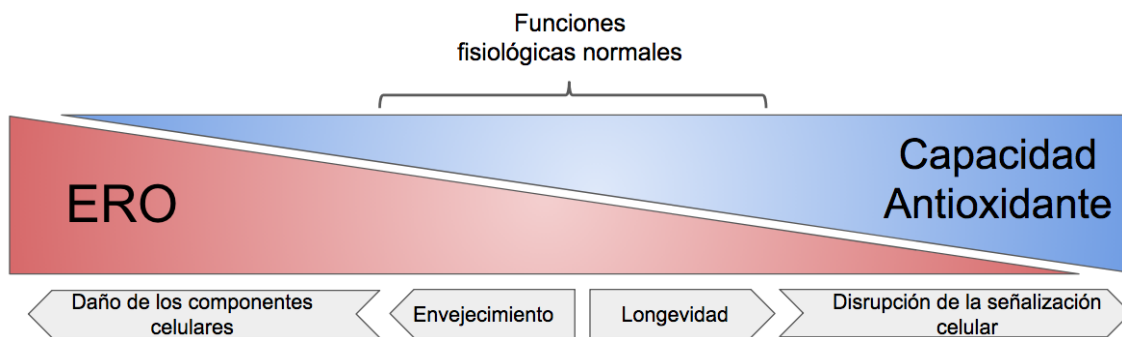


Figura 11. Equilibrio entre las ERO y la capacidad antioxidante modificado de (Storz, 2011)

Por lo tanto la cepa de *S. cerevisiae* que sobreexpresa la catalasa T de *D. hansenii* se encuentra en el extremo donde hay demasiada capacidad antioxidante y posiblemente falla en la iniciación de respuestas que preparan a las células para eventos de estrés, afectando el lapso de vida cronológico.



## 8 CONCLUSIONES

- Se logró la expresión heteróloga estable de la catalasa T de *D. hansenii* al cambiar el promotor nativo por el promotor *GAL1* en el vector pYES2/CT.
- La actividad específica de catalasa de la cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* transformada con pYES2GAL1*DhCTT* es mayor a la actividad del resto de las cepas de este experimento, esto se debe en parte al plásmido pYES2/CT que es multicopia que incrementa la dosis génica.
- La sobreexpresión de la catalasa T de *D. hansenii* en una cepa acatalasémica de *S. cerevisiae*, no afecta la dinámica de crecimiento en medio SMM; tampoco la ausencia de la enzima genera cambios en la dinámica de crecimiento.
- Sobreexpresar la catalasa T de *D. hansenii* en una cepa acatalasémica de *S. cerevisiae* o la elevada actividad de catalasa, previene la extensión del lapso de vida cronológico en presencia de galactosa, a diferencia de la cepa silvestre y la cepa acatalasémica, pudiendo ser este más corto que el de la cepa acatalasémica.
- La tolerancia al choque de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se incrementa al sobreexpresar la catalasa T de *D. hansenii* y es determinante en la sobrevivencia.

## 9 Anexo Protocolos

### 9.1 Extracción de DNA genómico para levadura (PCI)

- 1.- Crecer a *Debaryomyces hansenii* o a *Saccharomyces cerevisiae* en 10 mL de medio de cultivo YPD a 28 °C durante 12 horas.
- 2.- Centrifugar 10 minutos a 3 Krpm, decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 5 mL de agua bidestilada estéril.
- 3.- Preparar alícuotas de 500 µL en tubos de polipropileno de 1.5 mL.
- 4.- Centrifugar 5 segundos a 14 Krpm y decantar el sobrenadante, resuspender la pastilla en el líquido residual.
- 5.- Agregar 200 µL de la solución 1 (Tabla 9) y 200 µL de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y 300 µg de perlas estériles.

Tabla 9.: Preparación de la solución 1

	Reactivo	Concentración
Solución 1	Tritón X-100	2%
	SDS (dodecilsulfato sódico)	1%
	NaCl	100 mM
	Tris HCl, pH 8.0 (tris(hidroximetil)aminometano)	10 mM
	EDTA ácido etilendiaminotetraacético	1mM

6.- Agitar en el vortex a máxima potencia durante 2 minutos y agregar 300  $\mu$ L de agua o TE (Tabla 10).

*Tabla 10. Preparación de TE 10X*

	Reactivo	Concentración
TE 10X (Tris EDTA)	Tris HCl, pH 7.5	100 mM
	EDTA, pH 8	10 mM

7.- Centrifugar 5 minutos a 14 Krpm y pasar la fase acuosa a un tubo de polipropileno de 1.5 mL nuevo.

8.- Agregar 1 mL de etanol al 100% y mezclar por inversión 20 veces, centrifugar 2 minutos a 14 Krpm, decantar el sobrenadante y resuspender en 400  $\mu$ L de agua bidestilada estéril.

9.- Agregar 3  $\mu$ L de RNAsa 10  $\mu$ g/ $\mu$ L e incubar a 37 °C durante 5 minutos

10.- Agregar 8  $\mu$ L de acetato de amonio 4 M y 1 mL de etanol al 100% y mezclar.

11.- Centrifugar 2 minutos a 14 Krpm, lavar una vez con etanol al 70% y resuspender en 200  $\mu$ L de agua bidestilada estéril.

12.- Extraer dos veces más con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y una vez con cloroformo-isoamílico (24:1).

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

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

15.- Resuspender en 20 o 50 µL de agua bidestilada estéril o TE.

16.- Almacenar a -20 °C.

## 9.2 Amplificación mediante PCR de alta fidelidad del gen *DhCTT*.

Las reacciones de PCR de alta fidelidad se llevaron a cabo con el estuche comercial *Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix* de Thermo Fisher Scientific de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las temperaturas de alineamiento se calcularon utilizando la aplicación que provee el fabricante del estuche (Tabla 11).

1. Descongelar el DNA molde (DNA genómico de *D. hansenii*) en hielo junto con el resto de los reactivos.
2. Preparar las reacciones de la siguiente manera:

Tabla 11. Mezcla de PCR para amplificar *DhCTT*

H <sub>2</sub> O bidestilada	cbp 20 µL
2X Phusion Flash PCR Master Mix	10 µL
Cebador Fw ( <i>DhCTTOHindIII</i> Fw)	0.5 µM
Cebador Rv ( <i>DhCTTOXhoI</i> Rv)	0.5 µM
gDNA molde ( <i>D. hansenii</i> )	10-100 ng

3. Preparar un control sustituyendo el DNA templado por agua.



- Colocar los tubos que contienen las reacciones en el termociclador y programar (Tabla 12).

Tabla 12. Programa para amplificar DhCTT en un termociclador

Desnaturalización inicial	98°C/20 segundos	1X
Desnaturalización	98°C/5 segundos	5X
Alineamiento	60.4°C/10 segundos	
Extensión	72.4°C/25.5 segundos	
Desnaturalización	98°C/5 segundos	15X
Alineamiento	63.4°C/10 segundos	
Extensión	72°C/25.5 segundos	
Extensión final	72°C/60 segundos	1X
Mantenimiento	4 °C/ infinito	1X

- Almacenar a -20°C.

### 9.3 PCR para amplificar DhCTT-TRP1

Se utilizó el kit *Thermo Scientific Flash-High Fidelity Master Mix*, las temperaturas de fusión se calcularon en el sitio web de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El diseño del programa de PCR se realizó de acuerdo con las características de la polimerasa y los *cebadores* (Tabla 13).

El amplicón producido con los *cebadores DhCTT1F-TRP1/DhCTT1R-TRP1* tiene un total de 3274 pares de bases, incluye al marco abierto de lectura que codifica para la catalasa T de *D. hansenii* (*DhCTT*) y se incluyen 1000 pb río arriba de este para abarcar la región promotora y 50 pb río arriba de la región promotora con la región idéntica al gen *TRP1* de *S. cerevisiae*. Río abajo del marco de lectura abierto se incluyen 300 pb que comprenden la región 3' UTR y río abajo de esta 50 pb con identidad con el gen *TRP1* de *S. cerevisiae*.



### 9.3.1.1 Mezcla para la PCR

Tabla 13. Mezcla para la PCR de DhCTT-TRP1

H <sub>2</sub> O	cbp 50 µL
2x Phusion master mix	50 µL
Cebador DhCTTF-TRP1	0.2 µM
Cebador DhCTTR-TRP1	0.2 µM
DNA molde	25 ng

Desnaturalización inicial .....10 segundos a 98 °C  
Desnaturalización .....1 segundo a 98 °C  
Alineamiento .....15 segundos a 66 °C  
Extensión .....1 minuto a 72°C  
Extensión final.....1 minuto a 72°C

} 25X

El producto de PCR se purificó y se utilizó para transformar a la levadura *S. cerevisiae*, con el protocolo de transformación descrito en esta tesis.

## 9.4 Doble digestión de pYES2/CT con *HindIII* y *XhoI*

Una minipreparación ya purificada del vector pYES2/CT (figura 3) fue donada amablemente por la Dra. Nuria Sánchez Puig del Instituto de Química de la UNAM. Las digestiones se llevaron a cabo con enzimas de restricción de *Thermo Fisher Scientific*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para obtener suficiente producto digerido es recomendable digerir 2 µg del plásmido pYES2/CT en dos reacciones de 50 µL.

1. Cuantificar en el nanoespectrofotómetro la concentración de la minipreparación de pYES2/CT.
2. En caso de ser necesario preparar diluciones para ajustar la concentración a  $1 \mu\text{g}/10\mu\text{L} = 0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ .
3. Verificar la concentración de las diluciones.
4. Preparar el *master mix*, manteniendo en todo momento las enzimas de restricción en hielo (Tabla 14).

Tabla 14. Master mix para una reacción de digestión de 50  $\mu\text{L}$ :

Agua libre de nucleasas	32.5 $\mu\text{L}$
Buffer R (10X)	5 $\mu\text{L}$
DNA (1 $\mu\text{g}$ )	10 $\mu\text{L}$
<i>Hind</i> III (10 U/ $\mu\text{L}$ )	1.25 $\mu\text{L}$
<i>Xho</i> I (10 U/ $\mu\text{L}$ )	1.25 $\mu\text{L}$

5. Incubar de 12 a 16 horas a 37°C.
6. Guardar a -20°C hasta su uso en otras aplicaciones.

## 9.5 Purificación de la digestión de productos digeridos con *Hind*III y *Xho*I

Se purificaron tanto el plásmido pYES2/CT como el producto de PCR (*DhCTT*) usando el estuche comercial *QIAquick PCR purification kit* siguiendo las instrucciones del fabricante.

1. Transferir el producto de la digestión a un tubo de polipropileno de 1.5 mL y añadir 5 volúmenes de amortiguador PBI (100  $\mu$ L de pYES2/CT digerido con *Xho*I y *Hind*III + 500  $\mu$ L de amortiguador PBI).
2. Agregar 10  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M pH 5.0, mezclar y verificar que el color de la mezcla sea amarillo (si se ve naranja o violeta repetir este paso).
3. Transferir la mezcla a una columna con una membrana de sílica (*QIAquick column*) y colocar un tubo de recolección de 1.5  $\mu$ L debajo, centrifugar 60 segundos y descartar el líquido residual.
4. Agregar a la columna 750  $\mu$ L de amortiguador PE, centrifugar durante 60 segundos y descartar el líquido residual.
5. Centrifugar nuevamente durante 60 segundos para eliminar el etanol residual.
6. Para eluir el DNA añadir 50  $\mu$ L de amortiguador EB o agua bidestilada estéril, incubar a 55°C durante 10 minutos con la tapa del tubo cerrada, centrifugar durante 60 segundos utilizando un tubo nuevo de recolección de 1.5  $\mu$ L.
7. Cuantificar usando el nanoespectrofotómetro y guardar a -20°C.

## 9.6 Ligación de pYES2/CT con el amplicón *Hind*III-*DhCTT-Xho*I

Las ligaciones se llevaron a cabo utilizando el *kit T4 DNA ligation* de *Thermo Fisher Scientific* siguiendo las instrucciones del fabricante. Se llevaron a cabo en dos distintas relaciones vector inserto, 1:3 (Tabla 15) y 1:5 (Tabla 16).

1. Descongelar y mantener en hielo el DNA a ligar.

2. Preparar la mezcla de reacción, cuidando en todo momento que el amortiguador de la ligación y la ligasa se mantengan en hielo, de la siguiente manera:

*Tabla 15. Mezcla para la ligación 1:3, 100 ng vector*

pYES2/CT (154 ng/ $\mu$ L) digerido con <i>Hind</i> III- <i>Xho</i> I y purificado	0.64 $\mu$ L
Inserto digerido y purificado <i>Hind</i> III- <i>DhCTT-Xho</i> I (138 ng/ $\mu$ L)	0.6 $\mu$ L
<i>5X Rapid ligation buffer</i>	4 $\mu$ L
T4 DNA ligasa	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O dd estéril	13.76 $\mu$ L

Tabla 16. Mezcla para la ligación 1:5, 100 ng vector

pYES2/CT (154 ng/ $\mu$ L) digerido con <i>HindIII-XhoI</i> y purificado	0.64 $\mu$ L
Inserto digerido y purificado <i>HindIII-DhCTT-XhoI</i> (138 ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
<i>5X Rapid ligation buffer</i>	4 $\mu$ L
T4 DNA ligasa	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O dd estéril	13.36 $\mu$ L

3. Preparar los controles de autoligación sustituyendo el volumen de inserto digerido por agua.
4. Dejar incubar la reacción a temperatura ambiente por 5 minutos.
5. Transformar inmediatamente células quimiocompetentes de *E. coli* (de no ser posible, almacenar a -20).

## 9.7 Preparación de células quimiocompetentes de *E. coli*

1. Incubar la cepa de *Escherichia coli* deseada en 2 mL de LB/8 horas/37°C.
2. Inocular con el precultivo 100 mL de LB en una relación 1/100 e incubar a 37°C/3horas/180rpm (hay que monitorear el cultivo hasta obtener una D.O.<sub>600 nm</sub> = 0.4).
3. Reposar el matraz 10 minutos en agua con hielo.
4. Centrifugar 30 segundos a 4°C/ 5Krpm, decantar el sobrenadante y lavar con CaCl<sub>2</sub> 100 mM e incubar en agua con hielo 10 minutos más.
5. Centrifugar a 5 Krpm y decantar el sobrenadante.
6. Resuspender en 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM/17% glicerol.

7. Separar en alícuotas de 100  $\mu$ L en tubos de polipropileno.
8. Guardar a -80 °C hasta el momento de utilizarse.

## 9.8 Transformación de *E. coli* quimiocompetentes

1. Descongelar las células competentes en hielo.
2. Agregar 200 ng de plásmido superenrollado.
3. Incubar en hielo de 10 a 30 minutos.
4. Dar un pulso a 42°C durante 1.5 minutos sin agitación.
5. Resuspender en 1 mL de LB precalentado a 37°C e incubar a 37°C/250rpm/1 hora.
6. Plaquear en cajas con el medio de selección adecuado, 50-100  $\mu$ L de diluciones seriales de 10.

## 9.9 PCR de colonia (*E. coli*)

1. Tomar una colonia aislada e inocular en 4 mL de medio LB, con antibiótico de ser requerido, a 250 rpm/37°C durante 16-18hrs.
2. A la mañana siguiente tomar 10  $\mu$ L del cultivo y transferirlos a un tubo de 0.6 mL, centrifugar a 14 Krpm y descartar el sobrenadante con micropipeta, teniendo cuidado de no tocar la pastilla.



3. Resuspender en 10  $\mu$ L de agua libre de nucleasas.
4. Incubar 2 minutos a 95°C e inmediatamente pasar 5 minutos al hielo (durante este tiempo preparar el *master mix* para el número de colonias deseadas (cada reacción de PCR fue de 10  $\mu$ L).
5. Justo antes de hacer el PCR, centrifugar a 14 Krpm durante 30 segundos y utilizar 2  $\mu$ L de la extracción para una reacción de 10  $\mu$ l de PCR.

Notas:

- El protocolo se debe llevar a cabo lo más rápido posible y se debe manejar el DNA en frío, ya que, al no haber un agente protector, se puede degradar rápidamente.
- Incluir un control negativo y uno positivo
- El resto del cultivo se puede centrifugar a 14 Krpm y en caso necesario, almacenar a -80°C durante una semana para posteriormente realizar una miniprep o extracción de DNA.

## 9.10 Protocolo de transformación de levadura

1. Inocular 5 mL de YPD con la cepa a transformar y poner un matraz con 30 mL de YPD a precalentar a 28°C.
2. Incubar durante 12-16hrs/180rpm/28°C.
3. Inocular con 1 mL de YPD del cultivo de toda la noche los 30 mL de YPD precalentado y medir la D.O<sub>600nm</sub> (debería encontrarse cerca de 0.2).

4. Incubar a 180rpm/28°C hasta alcanzar una D.O<sub>600nm</sub> entre 0.4 – 0.6 (3-4 hrs).
5. Centrifugar durante 5 minutos a 3 Krpm y descartar el sobrenadante.
6. Resuspender la pastilla en 1 mL de H<sub>2</sub>O dd estéril y resuspender con ayuda del vortex.
7. Transferir a un tubo de 1.5 mL estéril.
8. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto y descartar el sobrenadante.
9. Resuspender en 200 µL de solución TEL (Tabla 17).

*Tabla 17. Preparación de solución TEL*

	Reactivo	Volumen
TEL (Tris, EDTA, Acetato de litio)	Amortiguador TE 10X pH 7.5	1 mL
	Acetato de litio 1 M	1 mL
	H <sub>2</sub> O dd	cbp 10 mL

10. Colocar 50 µL en 4 tubos de 0.6 mL (pueden quedar células en el tubo de 1.5 mL).
11. Agregar a cada tubo 5 µL de espermatozoides de salmón (10 µg/mL) previamente hervido a 95°C durante 5 minutos e inmediatamente puesto en hielo.

12. Agregar a cada tubo experimental 500 ng de plásmido, excepto a uno, que será el control negativo.
13. Agregar a cada tubo 300 µg de TELP (Tabla 18 )y mezclar con ayuda del vortex.

*Tabla 18. Preparación de solución TELP*

	Reactivo	Volumen
TELP	Amortiguador TE 10X, pH 7.5	1 mL
	Acetato de litio 1 M	1 mL
	PEG 4000 (50%)	8 mL
	H <sub>2</sub> O dd	cbp 10 mL

14. Incubar durante 30 minutos/30°C (a la mitad del tiempo mezclar 3 veces por inversión).
15. Agregar 40 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) y mezclar con el vortex.
16. Incubar a 42°C/15 minutos.
17. Incubar en hielo 2 minutos.
18. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante.
19. Resuspender cada pastilla en 100 µL de H<sub>2</sub>O.
20. Plaquear en cajas con el medio de selección adecuado.

21. Incubar a 28°C por 48-72 horas.

## 9.11 Medio de selección para mutantes *trp<sup>-</sup>*

Tabla 19. Composición del medio de selección 5-FAA

Glucosa	5 %
Agar bacteriológico	2 %
YNB sin sulfato de amonio ni aminoácidos	0.17 %
Sulfato de amonio	0.5 %
Casaminoácidos	0.6 %
Ácido 5- fluoroantranílico (5-FAA)	0.5 g/L

### Preparación

1. Esterilizar la glucosa y el agar disueltos, por separado del resto de los componentes, en el autoclave.
2. Esterilizar por filtración el sulfato de amonio, los casaminoácidos y el YNB.
3. Disolver el 5-FAA en etanol (10% P/V) y esterilizar por filtración.
4. Una vez esterilizados cada uno de los componentes, mezclarlos con ayuda de un agitador magnético.
5. Vaciar en cajas de Petri estériles.

## 9.12 Obtención de extracto proteico

Se obtuvieron extractos crudos de cultivos provenientes de medio mínimo, con rafinosa como fuente de carbono y suplementado o no con galactosa al 2% como inductor. Los extractos provienen de la fase exponencial de crecimiento, las células se colectaron después de este periodo y se lisaron de forma mecánica en presencia de un *buffer* de extracción de catalasas (Tabla 20).

1. Poner una microcentrífuga a 4°C y por cada extracto poner en el hielo un tubo de ensayo, una pipeta Pasteur y un tubo de polipropileno de 1.5 mL
2. Colectar las células de la fase exponencial de crecimiento, centrifugar a 3000 rpm y resuspender en agua bidestilada estéril, repetir una vez este paso
3. Resuspender en 1 mL de amortiguador de extracción de catalasas, pasar a los tubos de ensayo fríos y añadir ½ de volumen de microperlas de vidrio estériles.
4. Agitar un minuto en el vortex y dejar reposar un minuto en hielo, repetir este paso seis veces.
5. Transferir con ayuda de la pipeta Pasteur al tubo de polipropileno y centrifugar durante 20 minutos a 4°C
6. Recuperar el sobrenadante y almacenar a 4° por máximo 24 horas.

Tabla 20. Preparación de *buffer* de catalasas

<i>Buffer</i> de extracción de catalasas	
Reactivo	Concentración
Glicerol	20%
Tris HCl	0.1 M pH = 8

### 9.13 Ensayo de Bradford

1. Preparar el reactivo de Bradford en una proporción 5:1, una parte de Bradford por cuatro partes de agua estéril.
2. Añadir 20  $\mu\text{L}$  de BSA a 1 mL de reactivo de Bradford previamente preparado, poniendo por lo menos 4 puntos con concentraciones conocidas de BSA entre 0.1 mg/mL y 0.9 mg/mL).
3. Incubar la reacción durante 5 minutos a temperatura ambiente y leer la absorbancia a 590 nm.
4. Hacer diluciones de las muestras problema y añadir 20  $\mu\text{L}$  de la muestra diluida más 1 mL de reactivo de Bradford, incubar 5 minutos a temperatura ambiente y leer en el espectrofotómetro por triplicado a 590 nm (las lecturas deben quedar dentro de los valores obtenidos con la BSA).

### 9.14 Ensayo de actividad específica de catalasa

1. Preparar una solución 500 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con agua estéril y bidestilada.
2. En una celda de cuarzo añadir 2.9 mL de amortiguador de actividad de catalasa (Tabla 21), un volumen de entre 5 y 20  $\mu\text{L}$  de extracto proteico, 100  $\mu\text{L}$  de la solución 500 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y agitar tres veces por inversión.
3. Iniciar la lectura de la absorbancia a 240 nm y seguir el decaimiento durante tres minutos, tomando lecturas cada 30 segundos y calcular la pendiente por minuto
4. Calcular la actividad específica de catalasa con la siguiente fórmula:

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

Donde:

AEC = actividad específica de catalasa

m= pendiente / minuto

$\varepsilon$  = coeficiente de extinción molar del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( 43.6 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)

Volumen de la reacción en  $\mu\text{L}$  = 3 mL = 3000  $\mu\text{L}$

Tabla 21.: Preparación de buffer de actividad de catalasa

Buffer de actividad de catalasa	
Reactivo	Concentración
Fosfato de potasio	0.1 M
Tritón X-100	0.01%

## 9.15 Curvas de crecimiento

1. Crecer un preinóculo de la cepa deseada durante 12-16 hrs/180rpm/27°C/100 mL del medio adecuado.
2. Centrifugar las células a 3 Krpm por 5 minutos, descartar el sobrenadante, resuspender en 5 mL de dd H<sub>2</sub>O y repetir.
3. Preparar diluciones seriales de 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, agitar en el vortex y medir la D.O<sub>600nm</sub>.

4. Inocular 100 mL del medio deseado a una  $D.O_{600nm} = 0.05$ .
5. Incubar a  $27^{\circ}C/180$  rpm y tomar la  $D.O_{600nm}$  cada 3 horas durante 72 horas, de ser requerido preparar diluciones para que los datos registrados se encuentren entre 0.05 y 0.5  $D.O_{600nm}$ .

### 9.16 Choque de peróxido de hidrógeno

1. Resembrar la cepa deseada, de preferencia proveniente de glicerol, en medio sólido, e incubar a  $28^{\circ}C$  durante tres días en YPD agar.
2. Poner un preinóculo de la cepa deseada en incubación en medio YPD/12-16hrs/ $26^{\circ}C/180$  rpm/10 mL.
3. Centrifugar 5 minutos a 3 Krpm y descartar el sobrenadante, resuspender en agua destilada estéril y repetir este paso.
4. Resuspender las células lavadas en 1-5 mL de agua destilada estéril y preparar diluciones. Determinar la  $D.O_{600nm}$  e inocular 100 mL del medio deseado a una  $D.O_{600nm} = 0.05$  e incubar 12-16 hrs o 72 hrs / $26^{\circ}C/180$  rpm.
5. Centrifugar a 3 Krpm y descartar el sobrenadante, resuspender en agua destilada estéril y repetir.
6. Medir la  $D.O_{600nm}$  e inocular 40 mL del medio de cultivo fresco a una  $D.O_{600nm}$  de 0.5.
7. Homogeneizar y separar en alícuotas de 5 mL y agregar a cada uno de los tubos las concentraciones de  $H_2O_2$  que se busquen probar (Tabla 22).



Tabla 22. Preparación de los tubos para el reto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> partiendo de una solución al 30% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Tubo	μL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]
1	0	0mM
2	1.28	2.5mM
3	2.55	5mM
4	5.1	10mM
5	10.2	20mM
6	15.3	30mM
7	20.4	40mM

8. Incubar los tubos a 180 rpm/28°C/180 minutos.
9. Transferir a tubos para centrifuga, centrifugar a 3 Krpm durante 5 minutos y resuspender en 5 mL de H<sub>2</sub>O dd estéril.
10. Preparar diluciones seriales a 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>.
11. Poner gotas de 10 μL para cajas chicas de YPD o gotas de 20 μL en cajas grandes.
12. Incubar durante 72 hrs a 28°C.
13. Documentar con fotografías los resultados.

#### 9.16.1 Preparación para el experimento

Antes de iniciar el experimento preparar por cada cepa:

- 10 mL de YPD para preinóculo.
- 100 mL de medio de cultivo experimental.
- Suficiente agua bidestilada estéril.

- 4 cajas de YPD agar.
- 10 tubos cónicos de polipropileno de 50 mL.
- 40 mL de medio de cultivo en un tubo de 50 mL.
- 28 tubos de polipropileno de 1.5 mL.
- 7 tubos de ensayo estériles.
- 5 pipetas de vidrio estériles.
- Puntas para las micropipetas.

Las cantidades anteriores no contemplan errores y es recomendable preparar material extra por cualquier inconveniente.

### 9.17 Curvas de viabilidad

1. Inocular 50 mL de medio deseado con la cepa de *S. cerevisiae* del experimento e incubar a 28 °C /180 rpm/ 12 hrs.
2. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos, resuspender en H<sub>2</sub>O bb (repetir 2 veces).
3. Inocular 100 mL de medio de cultivo deseado a 0.05 D.O.<sub>600 nm</sub> e incubar a 28°C /180 rpm hasta llegar a una D.O.<sub>600 nm</sub> entre 1 - 2.
4. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos y resuspender en 5 mL H<sub>2</sub>O dd estéril (repetir 2 veces).
5. Inocular 100 mL de H<sub>2</sub>O dd estéril a una D.O.<sub>600 nm</sub> de 0.05 e incubar a 28°C /180 rpm/ durante 30 días.
6. Tomar cada día 0.5 mL de cultivo y diluir 1000 veces.

7. En una caja Petri de 10 cm de diámetro con medio rico YPD, plaquear 0.3 mL y repartir con 6 perlas de siembra estériles.
8. Incubar las cajas durante 72 horas y hacer el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

## 10 LISTA DE ABREVIATURAS

ATP .- Adenosín Trifosfato

cAMP.- Adenosín Monofosfato Cíclico

CTT1.- Gen que codifica para la catalasa T de *S. cerevisiae*

DNA.- Ácido Desoxirribonucleico

ERO.- Especies Reactivas del Oxígeno

Promotor GAL1.- Promotor del gen de la galactocinasa

gDNA.- Ácido Desoxirribonucleico Genómico

Gpx3p.- Es una tiol peroxidasa involucrada en la detección de los niveles de hidroperóxidos y transduce la señal a Yap1p.

HSE.- Elementos de choque térmico

HSP.- Proteínas de choque térmico

MCA1.- Cisteín proteasa, involucrada en el inicio de la apoptosis en *S. cerevisiae*

Msn2.- Factor transcripcional involucrado en la respuesta a estrés de *S. cerevisiae*

Msn4.- Factor transcripcional involucrado en la respuesta a estrés de *S. cerevisiae*

NAD.- Nicotinamida adenina dinucleótido

NADH.- Nicotinamida adenina dinucleótido reducido

Nde1, . Nicotinamida adenina dinucleótido reducido deshidrogenasa mitocondrial en *S. cerevisiae*

Nde2 .- Nicotinamida adenina dinucleótido reducido deshidrogenasa mitocondrial en *S. cerevisiae*

PKA.- Proteína cinasa relacionada a la extensión del lapso de vida en ausencia de nutrientes implicada en la vía Ras - cAMP

Ras.- Regula la adenilato ciclase, implicada en la progresión del ciclo celular de *S. cerevisiae*

rDNA.- DNA ribosomal

ROS.- Especies reactivas del oxígeno

Sch9.- Proteín cinasa implicada en la vía TOR y en la respuesta a estrés de *S. cerevisiae*

Sir2.- Deacetilasa de histonas principalmente de proteínas en las regiones teloméricas de *S. cerevisiae*, está implicada en el lapso de vida

Skn7.- Factor transcripcional implicado en la respuesta a estrés de *S. cerevisiae*

SMM.- Medio mínimo sintético

SOD.- Superóxido dismutasa

STRE.- Elemento de unión a proteínas implicadas en la respuesta a estrés de *S. cerevisiae*.

TOR.- Target of rapamicyn

TRP1.- Gen que codifica para la fosforribosil antranilato sintasa en *S. cerevisiae*

UFC.- Unidades formadoras de colonias

Yap1.- factor de transcripción implicado en la respuesta a estrés oxidante (Yes associated protein one)

YRE.- Elemento de reconocimiento de Yap

## 12 LITERATURA CITADA

- Aebi, H. E. (1983). Catalase. *Methods of enzymatic analysis*.
- Bayr, H. (2005). Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine*, 33(Suppl), S498–S501.
- Beckman, K. B., y Ames, B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78(2), 547–581.
- Betteridge, D. J., y John Betteridge, D. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism: Clinical and Experimental*, 49(2), 3–8.
- Biliński, T., Litwińska, J., Błaszczński, M., y Bajus, A. (1989). Superoxide dismutase deficiency and the toxicity of the products of autooxidation of polyunsaturated fatty acids in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1001(1), 102–106.
- Bilinski, T., y Zadrag-Tecza, R. (2014). The rules of aging: are they universal? Is the yeast model relevant for gerontology? *Acta Biochimica Polonica*, 61(4), 663–669.
- Biliński, T., Zadrąg-Tęcza, R., y Bartosz, G. (2011). Hypertrophy hypothesis as an alternative explanation of the phenomenon of replicative aging of yeast. *FEMS Yeast Research*, 12(1), 97–101.
- Bisschops, M. M., Vos, T., Martínez-Moreno, R., Cortés, P. T., Pronk, J. T., y Daran-Lapujade, P. (2015). Oxygen availability strongly affects chronological lifespan and thermotolerance in batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 2(11), 429–444.
- Blagosklonny, M. V. (2012). Answering the ultimate question “what is the proximal cause of aging?” *Aging*, 4(12), 861–877.
- Boender, L. G. M., Almering, M. J. H., Dijk, M., van Maris, A. J. A., de Winde, J. H., Pronk, J. T., y Daran-Lapujade, P. (2011). Extreme calorie restriction and energy source starvation in *Saccharomyces cerevisiae* represent distinct physiological states. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(12), 2133–2144.

- Bo-Htay, C., Palee, S., Apaijai, N., Chattipakorn, S. C., y Chattipakorn, N. (2018). Effects of d-galactose-induced ageing on the heart and its potential interventions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(3), 1392–1410.
- Boiteux, S., Gellon, L., y Guibourt, N. (2002). Repair of 8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*: interplay of DNA repair and replication mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(12), 1244-1253.
- Boiteux, S., y Jinks-Robertson, S. (2013). DNA repair mechanisms and the bypass of DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 193(4), 1025-1064.
- Breuer, U., y Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23(6), 415-437.
- Burhans, W. C., y Weinberger, M. (2012). DNA damage and DNA replication stress in yeast models of aging. *Sub-Cellular Biochemistry*, 57, 187–206.
- Burke, R. M., y Jennings, D. H. (1990). Effect of sodium chloride on growth characteristics of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* in batch and continuous culture under carbon and potassium limitation. *Mycological Research*, Vol. 94, pp. 378–388. [https://doi.org/10.1016/s0953-7562\(09\)80362-6](https://doi.org/10.1016/s0953-7562(09)80362-6)
- Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., y Ros, J. (2000). Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(35), 27393–27398.
- Campos, S. E., Avelar-Rivas, J. A., Garay, E., Juárez-Reyes, A., y DeLuna, A. (2018). Genomewide mechanisms of chronological longevity by dietary restriction in budding yeast. *Aging Cell*, 17(3), e12749.
- Castillo, R. (2013). *Expresión del gen DhCTT1 de Debaryomyces hansenii en una mutante acatalasémica de Saccharomyces cerevisiae* (BSc; C. Segal, Ed.). Universidad Nacional Autónoma de México.

- Chan, K.-M., Liu, Y.-T., Ma, C.-H., Jayaram, M., y Sau, S. (2013). The 2 micron plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*: a miniaturized selfish genome with optimized functional competence. *Plasmid*, 70(1), 2–17.
- Chelikani, P., Fita, I., y Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 61(2), 192–208.
- Dechant, R., y Peter, M. (2008). Nutrient signals driving cell growth. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(6), 678–687.
- Delaunay, A., Isnard, A.-D., y Toledano, M. B. (2000). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *The EMBO Journal*, Vol. 19, pp. 5157–5166. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.19.5157>
- Dunlop, R. A., Brunk, U. T., y Rodgers, K. J. (2009). Oxidized proteins: Mechanisms of removal and consequences of accumulation. *IUBMB Life*, Vol. 61, pp. 522–527. <https://doi.org/10.1002/iub.189>
- Eleutherio, E., Panek, A., De Mesquita, J. F., Trevisol, E., y Magalhães, R. (2015). Revisiting yeast trehalose metabolism. *Current Genetics*, 61(3), 263–274.
- Fabrizio, P., Pozza, F., Pletcher, S. D., Gendron, C. M., y Longo, V. D. (2001). Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science*, 292(5515), 288–290.
- Fang, J., y Beattie, D. S. (2003). External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide. *Free Radical Biology y Medicine*, 34(4), 478–488.
- Farrugia, G., y Balzan, R. (2012). Oxidative Stress and Programmed Cell Death in Yeast. *Frontiers in Oncology*, Vol. 2. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00064>
- Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C., y Struhl, K. (1997). Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 17, pp. 6982–6993. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.12.6982>

- Finn, K., Lowndes, N. F., y Grenon, M. (2012). Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 69(9), 1447–1473.
- Flatt, T. (2012). A new definition of aging? *Frontiers in Genetics*, 3, 148.
- Flora, S. J. S. (2014). *Handbook of Arsenic Toxicology*. Academic Press.
- Florea, M. (2017). Aging and immortality in unicellular species. *Mechanisms of Ageing and Development*, 167, 5–15.
- Fontana, L., Partridge, L., y Longo, V. D. (2010). Extending Healthy Life Span--From Yeast to Humans. *Science*, 328(5976), 321–326.
- García, M. A. (2014). *Las catalasas de Debaryomyces hansenii: análisis de la complementación heteróloga en una mutante acatalasémica de Saccharomyces cerevisiae* (Licenciatura; C. A. Segal, Ed.). UNAM.
- Góth L., Nagy T., y Káplár M. (2015). Acatlasemia and type 2 diabetes mellitus. *Orvosi hetilap*, 156(10), 393–398.
- Gross, E., Sevier, C. S., Heldman, N., Vitu, E., Bentzur, M., Kaiser, C. A., ... Fass, D. (2006). Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(2), 299–304.
- Halliwell, B., y Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, USA.
- Hamilton, W. D. (1966). The moulding of senescence by natural selection. *Journal of Theoretical Biology*, 12(1), 12–45.
- Hansberg, W., Salas-Lizana, R., y Domínguez, L. (2012). Fungal catalases: function, phylogenetic origin and structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 170–180.



- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298–300.
- Hasan, R., Leroy, C., Isnard, A.-D., Labarre, J., Boy-Marcotte, E., y Toledano, M. B. (2002). The control of the yeast H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response by the Msn2/4 transcription factors. *Molecular Microbiology*, 45(1), 233–241.
- Henle, E. S., y Linn, S. (1997). Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(31), 19095–19098.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., y Cabisco, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1780(11), 1217–1235.
- Jay, K. A., Smith, D. L., y Blackburn, E. H. (2016). Early Loss of Telomerase Action in Yeast Creates a Dependence on the DNA Damage Response Adaptor Proteins. *Molecular and cellular biology*, 36(14), 1908–1919. doi:10.1128/MCB.00943-15
- Izawa, S., Inoue, Y., y Kimura, A. (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 320 ( Pt 1), 61–67.
- Kaeberlein, M., Powers, R. W., 3rd, Steffen, K. K., Westman, E. A., Hu, D., Dang, N., ... Kennedy, B. K. (2005). Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science*, 310(5751), 1193–1196.
- Kirkwood, T. B. L. (1992). The Disposable Soma Theory: Evidence and Implications. *Netherlands Journal of Zoology*, 43(3-4), 359–363.
- Klatt, P., y Lamas, S. (2000). Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 267(16), 4928–4944.
- Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., y Toledano, M. B. (1999).

- Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(23), 16040–16046.
- Longo, V. D., Shadel, G. S., Kaeberlein, M., y Kennedy, B. (2012). Replicative and Chronological Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metabolism*, Vol. 16, pp. 18–31. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.002>
- Madeo, F., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Büttner, S., Eisenberg, T., y Kroemer, G. (2009). Caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382(2), 227–231.
- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H., y Fröhlich, K. U. (1999). Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *The Journal of Cell Biology*, 145(4), 757–767.
- Minhas, A., Biswas, D., y Mondal, A. K. (2009). Development of host and vector for high-efficiency transformation and gene disruption in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 9(1), 95–102.
- Mohammad, K., Dakik, P., Medkour, Y., McAuley, M., Mitrofanova, D., y Titorenko, V. I. (2018). Some Metabolites Act as Second Messengers in Yeast Chronological Aging. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030860>
- Molon, M., Szajwaj, M., Tchorzewski, M., Skoczowski, A., Niewiadomska, E., y Zadrag-Tecza, R. (2016). The rate of metabolism as a factor determining longevity of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Age*, 38(1), 11.
- Nestelbacher, R., Laun, P., Vondráková, D., Pichová, A., Schüller, C., y Breitenbach, M. (2000). The influence of oxygen toxicity on yeast mother cell-specific aging. *Experimental Gerontology*, 35(1), 63–70.
- Noriega, D. (2012). Complementación heteróloga de una mutante acatalasémica de

- Saccharomyces cerevisiae* con el gen de la catalasa A de *Debaryomyces hansenii* (BSc; C. Segal, Ed.). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Park, P. U., Defossez, P. A., y Guarente, L. (1999). Effects of Mutations in DNA Repair Genes on Formation of Ribosomal DNA Circles and Life Span in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 19(5), 3848-3856.
- Prista, C., Michán, C., Miranda, I. M., y Ramos, J. (2016). The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast*, 33(10), 523–533.
- Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Naviliat, M., y Cayota, A. (2001). Unraveling Peroxynitrite Formation In Biological Systems. *Bio-Assays for Oxidative Stress Status*, pp. 236–261. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-50957-4.50038-7>
- Raitt, D. C., Johnson, A. L., Erkin, A. M., Makino, K., Morgan, B., Gross, D. S., y Johnston, L. H. (2000). The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Molecular Biology of the Cell*, 11(7), 2335–2347.
- Rang, C. U., Peng, A. Y., y Chao, L. (2011). Temporal dynamics of bacterial aging and rejuvenation. *Current Biology: CB*, 21(21), 1813–1816.
- Rani, V., Mishra, S., Yadav, T., Yadav, U. C. S., y Kohli, S. (2014). Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. In *Free Radicals in Human Health and Disease* (pp. 105–116).
- Sadowska-Bartos, I., y Bartosz, G. (2014). Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity. *BioMed Research International*, 2014.
- Scandalios, J. G. (2002). The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(9), 483–486.
- Segal-Kischinevsky, C., Rodarte-Murguía, B., Valdés-López, V., Mendoza-Hernández, G., González, A., y 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.
- Siegel, M. L. (2015). Shifting Sugars and Shifting Paradigms. *PLOS Biology*, Vol. 13, p.

- e1002068. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002068>
- Song, R., Sarnoski, E. A., y Acar, M. (2018). The Systems Biology of Single-Cell Aging. *iScience*, 7, 154–169.
- Storz, P. (2011). Forkhead Homeobox Type O Transcription Factors in the Responses to Oxidative Stress. *Antioxidants y Redox Signaling*, Vol. 14, pp. 593–605. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3405>
- Switala, J., y Loewen, P. C. (2002). Diversity of properties among catalases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 401, pp. 145–154. [https://doi.org/10.1016/s0003-9861\(02\)00049-8](https://doi.org/10.1016/s0003-9861(02)00049-8)
- Toledano, M. B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector, D., y Azevedo, D. (2003). Oxidative stress responses in yeast. *Topics in Current Genetics*, pp. 241–303. [https://doi.org/10.1007/3-540-45611-2\\_6](https://doi.org/10.1007/3-540-45611-2_6)
- Valdez, L. B., Lores Arnaiz, S., Bustamante, J., Alvarez, S., Costa, L. E., y Boveris, A. (2000). Free radical chemistry in biological systems. *Biological Research*, 33(2), 65–70.
- Vershinin, A. V., Schwarzacher, T., y Heslop-Harrison, J. S. (1995). The Large-Scale Genomic Organization of Repetitive DNA Families at the Telomers of Rye Chromosomes. *The Plant Cell*, 7(11), 1823.
- Wei, M., Fabrizio, P., Hu, J., Ge, H., Cheng, C., Li, L., y Longo, V. D. (2008). Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genetics*, 4(1), e13.