



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*:
Análisis de su expresión

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Claudia Andrea Segal Kischinevzky

Tutora Principal de Tesis: Dra. María Alicia González Manjarrez

Comité Tutor

**Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros
Dr. Roberto Coria Ortega.**

MÉXICO, D.F.

Febrero, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

No hay plazo que no se cumpla

AGRADECIMIENTOS

Es muy complejo agradecer y reconocer a todos los que han contribuido para que ¡al fin! yo obtenga un Doctorado, pero hay personas que se han distinguido particularmente:

La Dra. Luisa Alba Lois, quien está detrás de todo este trabajo y de lo que hago. Te agradezco inmensamente el haberme invitado a colaborar contigo de manera tan fructífera y productiva, de permitirme ser parte de tu laboratorio, de apoyarme incondicionalmente, de trabajar tête a tête diseñando y escribiendo. Eres mi consejera y mi amiga y eres la mejor de las *roomies*.

La Dra. Alicia González Manjarrez, que a lo largo de estos ya más de 25 años me ha llenado con sus enseñanzas. Has estado en cada uno de mis tropezones y me has ayudado a levantarme, incluso aquellas veces en las que también para ti era un inmenso esfuerzo auxiliarme. Siempre me has abierto las puertas de tu laboratorio y hasta las de tu casa. Por algo eres *LA MISS*. No sólo eres una GRAN investigadora, eres también un GRAN ser humano, combinación que no he encontrado con mucha frecuencia.

El Dr. Roberto Arreguín, al que realmente fue un gusto conocer y que formara parte de mi Comité Tutorial, sinodal del examen de candidatura y jurado en el de grado. Tus enseñanzas y tus comentarios siempre fueron un aporte importante a este trabajo.

El Dr. Roberto Coria, quien como miembro del Comité Tutorial y jurado de este trabajo y anteriores, siempre me ha apoyado de manera crítica y reflexiva.

El Dr. Salvador Uribe Carvajal, que analizó detalladamente este trabajo, aportándome observaciones muy pertinentes. Espero haber logrado mejorarlo.

El Dr. Jorge Luis Folch Mallol, quien ha estado en gran parte del camino recorrido, siempre presente y siempre apoyando. Te agradezco todos estos años de andanzas juntos y estas porras finales.

El Dr. Ernesto Ortiz Suri, mi mejor amigo. Te tomaste el tiempo para revisar crítica y detalladamente este trabajo. Tus aportaciones contribuyeron sin duda a mejorarlo. De la misma manera, has estado ahí para analizar también muchos aspectos académicos y no académicos de mi vida, siempre contribuyendo a mejorarla...y quién sabe, quien quita y en el futuro hasta seamos familia... ¡¡gracias Elnesto!!...

La M en C Cristina Aranda siempre dispuesta a proporcionar el apoyo técnico necesario para ayudarme a diseñar e implementar, con su paciencia infinita, los experimentos que hago en el laboratorio de la *Miss*...y porque lo sabe todo...

Los miembros del laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias, sobre todo, el Dr. Víctor Valdés, quien felizmente está ya de vuelta y a Alfonso, Epifanio, Bibiana, Arístides...

Los cientos de alumnos que han pasado por mis clases de Biología Molecular de la Célula 1 y Biotecnología. Con su entusiasmo y creatividad me enseñan que sí hay futuro para México. A mis estudiantes que convierten cada día en un reto, los de antes y los de ahora: Gerardo Figueroa, Erika Loera, Francisco Parada, Mauricio Sánchez, Diego Noriega, Román Castillo, Mónica Hernández y Daniel Ochoa.

Mis padres, Rosita y Patricio, merecen también mención especial, porque su apoyo y su cariño incondicional me ayudó y nos ayuda permanente a seguir adelante. Y el Moshi porque es un amor... y sus papás también...

Mis amigas de toda y gran parte de la vida: Elena, Irla, Mariela, Pilar, Hor, Claudia V, Citla, Esperanza, Paula que juega un papel dual, Nury...

Desde luego, la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Finalmente, la M en C Beatriz Rodarte Murguía, por el apoyo técnico prestado a lo largo de todo este trabajo...y por todo lo demás y porque sin tu apoyo me pierdo... A ti te dedico este trabajo ¡¡¡Échale ganas!!!

*Quienes tuvieron que aguantar mis ausencias, histerias y
preocupaciones y a quienes debo mis triunfos
Ximena y Tania,
mis niñas hermosas*

*A Jaime, porque eres mi sostén
y el de ellas.
Te amo.*

Gracias

ABREVIATURAS

•NO - Óxido nítrico	MetOH - Metanol
•NO ₂ - Dióxido de nitrógeno	mmin - Pendiente por minuto
•OH - Radical hidroxilo	NaCl - Cloruro de sodio
¹ O ₂ - Oxígeno singulete	NADP-GDH - Glutamato deshidrogenasa biosintética
3-AT - 3-amino-1, 2, 4-triazol	NOX - NADPH oxidasas
³² P - Isótopo radiactivo del fósforo	O ₂ - Oxígeno molecular
A ₂₄₀ - Absorbancia a una longitud de onda de 240 nm (región UV)	O ₂ ^{-•} - Anión superóxido
ATA - Ácido aurintricarboxílico	¹ O ₂ - Oxígeno singulete
<i>C. albicans</i> - <i>Candida albicans</i>	ONOO ⁻ - Peroxinitrito
<i>C. glabrata</i> - <i>Candida glabrata</i>	ONOOH - Ácido peroxinitroso
<i>CaCat1</i> - Catalasa 1 de <i>Candida albicans</i>	ORF - Marco de lectura abierto
CO ₃ ^{-•} - Radical carbonato	PAGE - Gel de poliacrilamida para electroforesis
<i>CTA1</i> - Gen que codifica a la catalasa A, peroxisómica	pb - Pares de bases.
CTA1 - Catalasa A	PCR - Reacción de la polimerasa en cadena
<i>CTT1</i> - Gen que codifica a la catalasa T, citoplasmática	PHGPx - Glutatió peroxidasa de fosfolipohidroperóxidos
CTT1 - Catalasa T	pI - Punto isoeléctrico
<i>D. hansenii</i> - <i>Debaryomyces hansenii</i>	PSA - Persulfato de amonio
DEPC - Dietilpirocarbonato	rDNA - Región en el DNA en los que están genes que codifican al RNA ribosomal
<i>Dh</i> - <i>Debaryomyces hansenii</i>	Rédox - Reducción-oxidación
DTT - Ditioneitol	ROOH - Hidroperóxidos orgánicos
EROs - Especies reactivas de oxígeno	<i>S. cerevisiae</i> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
EtBr - Bromuro de etidio	<i>Sc</i> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
EtOH - Etanol	SN Asn - Medio mínimo para levaduras, con asparagina 7.5 mM como única fuente de nitrógeno
FMN - Mononucleótido de flavina	SOD - Superóxido dismutasa
Glic - Glicerol	STRE - Elemento de respuesta a estrés
GPx - Glutatió peroxidasa	Tm - Temperatura de desnaturalización para un segmento de DNA dado
GSH - Glutatió reducido	UTR - Región en el extremo 3' de un gen que se transcribe, pero no se traduce
GSSG - Glutatió oxidado	V _{max} - Velocidad máxima
H ₂ O - Agua	<i>Y. lipolytica</i> - <i>Yarrowia lipolytica</i>
H ₂ O ₂ - Peróxido de hidrógeno	YPD - Medio rico para levaduras, con glucosa como fuente de carbono
HClO - Ácido hipocloroso	YPE - Medio rico de levaduras, con etanol como fuente de carbono
<i>K. lactis</i> - <i>Kluyveromyces lactis</i>	ε. Coeficiente de extinción molar
KCl - Cloruro de potasio	
kDa - Kilodaltones	
MAE - Amortiguador con MOPS, acetato de sodio y EDTA	
Mb - 10 ⁶ pb	

CONTENIDO

I. RESUMEN	1
I.1 ABSTRACT	3
II. INTRODUCCIÓN	5
II.1 CLASIFICACIÓN Y MECANISMOS DE PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS	6
II.2 PRINCIPALES SISTEMAS DE DEFENSA EN LA NEUTRALIZACIÓN DE RADICALES LIBRES EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS	10
II.2.1 Enzimas	11
II.2.2 Mecanismos no enzimáticos	15
II.3 REGULACIÓN GENÉTICA DE LA RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO EN LEVADURAS	16
II.4 ¿CÓMO SE PRODUCE EL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN LA β -OXIDACIÓN?	21
II.5 LAS CATALASAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
II.6 <i>Debaryomyces hansenii</i> COMO MODELO	25
II.6.1 ¿ <i>Debaryomyces hansenii</i> es una levadura halófila o eurihalina?	29
II.6.2 La ubicua <i>Debaryomyces hansenii</i>	30
II.6.3 <i>Debaryomyces</i> en la biotecnología	31
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	35
V. RESULTADOS	47

Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*

V.1 <i>Debaryomyces hansenii</i> ES UNA LEVADURA EURIHALINA.....	47
V.2 <i>Debaryomyces hansenii</i> ES CAPAZ DE CRECER EN FUENTES DE CARBONO NO FERMENTABLES.....	51
V.3 LA ACTIVIDAD DE CATALASA DETERMINADA <i>in vitro</i> DE <i>Debaryomyces hansenii</i> ES MÁS ALTA QUE LA DE <i>S. cerevisiae</i> EN LAS MISMAS CONDICIONES	54
V.4 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LEVADURAS UTILIZANDO LA SECUENCIA DE CATALASA.....	57
V.5 <i>Debaryomyces hansenii</i> TIENE DOS ENZIMAS CON ACTIVIDAD DE CATALASA CON DIFERENTE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA.....	68
V.6 LAS CATALASAS DE <i>Debaryomyces hansenii</i> MUESTRAN ACTIVIDAD DIFERENCIAL DEPENDIENDO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO	70
V.7 OBTENCIÓN DE RNA TOTAL DE <i>Debaryomyces hansenii</i> EN DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO.....	71
V.8 EN <i>Debaryomyces hansenii</i> LA TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL DE LOS GENES DE CATALASA ESTÁ REGULADA POR LA FUENTE DE CARBONO	76
V.9 PURIFICACIÓN DE LA CATALASA A DE <i>Debaryomyces hansenii</i>	77
V.10 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA CATALASA A DE <i>Debaryomyces hansenii</i> PURIFICADA	81
VI. DISCUSIÓN	86
VII. PUBLICACIÓN	91
VIII. REFERENCIAS.....	101

I. RESUMEN

Debaryomyces hansenii es una levadura eurihalina y criotolerante, que pertenece a las denominadas “no convencionales” y que fue aislada por primera vez en el mar, siendo clasificada como levadura marina. Sin embargo, se puede encontrar en todas las variedades de quesos y en jamones, salchichas y salmueras, e inclusive en productos lácteos y mermeladas; en la Naturaleza, en suelos, frutos y maderas en descomposición, etc. Esta capacidad de adaptación a gran variedad de nichos ecológicos es lo que hace a *D. hansenii* un organismo tan interesante de analizar., ya que posee la capacidad de desplegar respuestas de adaptación fisiológica a múltiples estímulos.

Al igual que *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii* tiene dos genes que codifican para catalasas, que identifiqué por similitud en la base de datos del genoma de la levadura no convencional. Utilizando las secuencias de catalasas de ambas levaduras, llevé a cabo una búsqueda entre todas las levaduras hemiascomicetas cuyo genoma está reportado, para hacer alineamientos e inferencias filogenéticas. Todos los organismos analizados tienen secuencias cuya función es peroxisómica, pero son pocos los que tienen también una catalasa citoplasmática.

Observé, a través de zimogramas, la presencia de estas dos enzimas con actividad de catalasa en *D. hansenii*. Asimismo, determiné la actividad específica, encontrando que en medio rico esta es más alta que la de *S. cerevisiae* y que se incrementa al doble cuando hay sal en el medio de cultivo.

También demostré que *D. hansenii* es capaz de crecer en medio rico conteniendo etanol, metanol o glicerol como única fuente de carbono y que ahí la actividad de catalasa es mucho más alta que en glucosa. Los zimogramas mostraron sólo una banda en fuentes de carbono no fermentables. Los análisis de expresión a nivel de la transcripción, mostraron que en glucosa predomina el transcrito de la catalasa citoplasmática mientras que en etanol lo hace la peroxisómica. Además, la actividad es regulada negativamente por la sal. Estos hallazgos me permiten proponer

Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*

que en *D. hansenii*, la actividad de catalasa está regulada por la fuente de carbono a nivel de la transcripción, mientras que el NaCl la regula de manera postrancricional. La catalasa mayoritaria en etanol fue purificada, analizada y secuenciada, demostrando ser la catalasa peroxisómica.

I.1 ABSTRACT

Debaryomyces hansenii is a euryhaline, cryotolerant microorganism, originally isolated from the sea, then classified as marine yeast. However, it is found in all types of cheese, brines as sausage, ham, and even dairy meals and jams. It also has the ability to grow in soils, woods, fruits, etc. So, to be able to survive in all these different ecological niches, *D. hansenii* must display an adaptive physiological response. In our laboratory, we are interested in studying the molecular and physiological response of *D. hansenii* to the presence of different salt concentrations under different culture media.

As *Saccharomyces cerevisiae*, *D. hansenii* has two different catalase encoding genes identified by its similarity in *D. hansenii* genome database. Using catalase sequences from both yeasts, I did a systematic hemiascomycetes genomic database searching, in order to construct biological inferences and phylogenetic relationships. I have found that the majority of organisms have the peroxisomal enzyme but the cytoplasmic one is constrained to a small group of yeasts.

I have done zymograms and I was able to visualize two bands with catalase activity. Also, I have determined the specific activity by using spectrophotometric methods showing that *D. hansenii* has a strong specific activity when grown in rich media, and it is slightly increased when grown in salty media.

I have found that this yeast can grow in non-fermentable carbon sources, as methanol, ethanol and glycerol; when the culture reaches the stationary phase, the catalase activity, using alcohols as carbon sources, increases spectacularly. Nonetheless if the culture contained NaCl the increment is not that high. Northern blot analyses showed that when using glucose as a carbon source, cytoplasmic catalase transcript is most abundant, while using ethanol instead, it is the peroxisomal catalase, which is mainly present. However, NaCl seems not to play any role at this regulatory level. I proposed that carbon sources regulate differential catalase

Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*

expression at a transcriptional level and NaCl at a posttranscriptional level. I isolated and purified a protein with a high catalase activity. I then sequenced it and found that it was in fact DhCTAp peroxisomal catalase. I also present the kinetic analysis of the purified catalase activity.

II. INTRODUCCIÓN

El oxígeno se puede reducir parcialmente dando lugar a diversos agentes químicamente reactivos, conocidos como Especies Ractivas de Oxígeno (EROs). Estas formas de oxígeno pueden ser altamente dañinas para los componentes celulares, incluyendo a los ácidos nucleicos, a los lípidos y a las proteínas (Halliwell y Gutteridge 1999, Hansberg 2008). Además de estas moléculas muy reactivas, tanto el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como el anión superóxido (O_2^-), son incluidos como EROs, ya que conducen a la producción de más especies reactivas, particularmente en presencia de iones metálicos. Las EROs se pueden generar endógenamente como consecuencia de los procesos metabólicos; también se forman por la exposición de las células a agentes ionizantes, radiación y recicladores rédox presentes en el medio y por la exposición a metales pesados. Así, todos los organismos aeróbicos están expuestos continuamente al ataque de agentes oxidantes a través de estos mecanismos. El estrés oxidativo ocurre cuando la concentración de estos oxidantes se incrementa por encima de la capacidad amortiguadora antioxidante de la célula (Valdez y cols. 2000). Dada la ubicuidad de las EROs, no es sorprendente que todos los organismos han desarrollado mecanismos para proteger a sus componentes celulares contra estos oxidantes altamente reactivos (Scandalios 2002).

Para defenderse contra estas especies reactivas de oxígeno, las células contienen enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa, las catalasas y varias peroxidasas, además de que también producen moléculas antioxidantes como el ascorbato, el tocoferol y el glutatión.

Pero además las EROs y las enzimas que las generan también son reconocidas por su papel crucial en la diferenciación celular: operan como activadores de factores de transcripción, pudiendo regular así a la expresión genética. Se ha mostrado que enzimas como las NADPH oxidasas (NOX) producen EROs que regulan distintas funciones celulares, como son la inmunidad, la proliferación celular, la diferenciación, la transducción de señales y el transporte de iones (Lambeth 2004). En plantas se ha propuesto que las EROs participan en la estructura de la pared celular y promueven también la muerte celular programada. Cuando las plantas son invadidas por

patógenos, éstas generan una amplia respuesta de defensa, incluyendo un estallido oxidativo (*oxidative burst*), que conlleva a la generación masiva y transitoria de EROs, en donde, por ejemplo, el $O_2^{\cdot-}$ actúa como un antibiótico de amplio espectro contra la invasión (Bolwell y Wojtaszek 1997). En células de levaduras y animales, las EROs pueden arrestar la división celular, regulando negativamente el ciclo celular (Scandalios 2002). En eucariontes unicelulares, las EROs correlacionan con la regulación de la expectativa de vida (*lifespan*), así como en las interacciones hospedero-patógeno (Aguirre y cols. 2005).

Por todas estas razones, es el balance entre la producción de EROs y la de las defensas celulares lo que determina el grado de estrés oxidativo.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* induce diversas respuestas adaptativas a la presencia de agentes oxidantes como el H_2O_2 , el anión superóxido y la peroxidación de los productos lipídicos. Las repuestas al estrés oxidativo parecen estar reguladas, al menos en parte, a nivel de la transcripción y exhiben una sobreposición considerable con otras respuestas a estrés, llevando a las células de levadura a contender de manera integrada a las distintas agresiones ambientales (Jamieson 1998, Tanghe y cols. 2006).

II.1 Clasificación y mecanismos de producción de radicales libres en los sistemas biológicos

La vida exhibe muchas paradojas. Una de ellas es que el oxígeno (O_2), una molécula esencial para la vida tal como la conocemos, es también una de las sustancias más tóxicas a causa de la reactividad de las especies parcialmente reducidas a las que puede dar lugar (Davies, 1995). El oxígeno atmosférico es un birradical: los electrones en sus orbitales antienlazantes $\pi_y^{*1} \pi_z^{*1}$ están desapareados y tienen el mismo espín, lo que da lugar al "lado oscuro" del oxígeno: el O_2 no puede reaccionar con moléculas orgánicas que tengan los electrones apareados con espines opuestos. Esta restricción implica que dentro del ambiente celular, el oxígeno con frecuencia es reducido de manera monovalente (no enzimática, figura 1): la reducción por un electrón del O_2 produce un anión superóxido, $O_2^{\cdot-}$; la adición de otro electrón y dos protones produce peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , y una tercera reducción separa al O_2 en un radical

hidroxilo, $\cdot\text{OH}$ y un anión hidróxido. Todas estas moléculas son productos normales de la vida en un ambiente aeróbico, pero al mismo tiempo, debido a su alta reactividad, son los agentes responsables de la toxicidad del oxígeno.

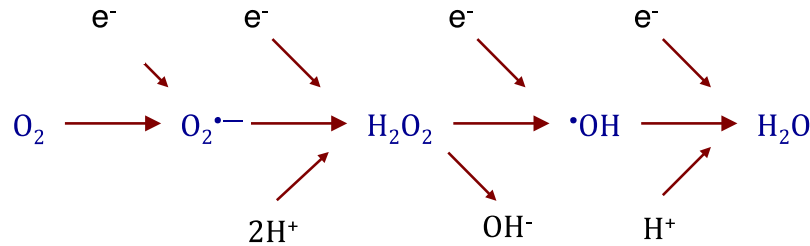


Figura 1. Vía monovalente de reducción del oxígeno molecular. En la parte de abajo se muestra la distribución de los electrones en los orbitales moleculares del oxígeno para cada especie formada. Las flechas verticales indican la dirección del momento magnético del espín de los electrones. El oxígeno molecular en su estado más estable es un birradical, ya que presenta dos electrones con el mismo espín ubicados en distintos orbitales.

Las radicales libres son especies químicas cuya estructura molecular presenta uno o más electrones no apareados en su orbital más externo, lo que provoca que la molécula sea inestable, de vida media corta y muy reactiva. Bajo esta definición, el peróxido de hidrógeno no es un radical, pero su capacidad de reaccionar con otras moléculas lo hace formar parte de las especies reactivas de oxígeno.

Las EROs son extremadamente ubicuas y difusibles, y se originan tanto como producto de actividades celulares, por ejemplo en la cadena respiratoria mitocondrial, en la cadena de transporte de electrones y en las reacciones de oxidación, como cuando las células son expuestas a radiación ionizante, a drogas que alteran el ciclo de óxido-reducción o a xenobióticos que forman metabolitos radicales libres *in situ*.

Al ser radicales, tienen la tendencia de sustraer electrones de las moléculas que los rodean (lípidos, proteínas, DNA) con el fin de completar su propia envoltura molecular, induciendo el daño celular (Freeman y Crapo, 1982).

Los radicales libres del oxígeno se pueden clasificar de la forma siguiente:

II.1.1 Radicales libres inorgánicos o primarios. Se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan los distintos estados en la reducción de éste y se caracterizan por tener una vida media muy corta; son el anión superóxido, el radical hidroxilo y el óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$).

II.1.2 Radicales libres orgánicos o secundarios. Se pueden originar ya sea por la transferencia de un electrón desde una molécula orgánica a un radical primario quedando así convertida en un radical, o bien por la reacción de 2 radicales primarios entre sí. Poseen una vida media un tanto más larga que los primarios. Se forman a partir de hidroperóxidos en las reacciones con iones de hierro divalente y dañan las estructuras celulares.

II.1.3 Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno. Aquí se incluye un grupo de especies químicas que sin ser radicales libres, son generadoras de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso (HClO), el peroxinitrito (ONOO^-) e hidroperóxidos orgánicos (ROOH).

Cuando se lleva a cabo la reducción del oxígeno en la respiración celular, a nivel de las mitocondrias, se producen en forma secundaria dos radicales libres: el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$). El radical superóxido deriva de la auto oxidación no enzimática de biomoléculas y se produce a partir de oxígeno y de otra sustancia que se oxida. El óxido nítrico proviene de la reducción enzimática del oxígeno realizada por la óxido nítrico sintetasa. La combinación de estos dos radicales libres forma al anión peroxinitrito. El peroxinitrito puede reaccionar directamente con biomoléculas tales como tioles y metaloproteínas, conduciendo a fenómenos oxidativos (Radi y cols. 2001).

Además, el peroxinitrito reacciona rápidamente con el dióxido de carbono presente en sistemas biológicos, conduciendo a la formación de radicales secundarios como radicales carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) y dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$). Finalmente, una pequeña fracción de ONOO^- se parte, dando lugar a la formación de $\cdot\text{OH}$ (figura 2):

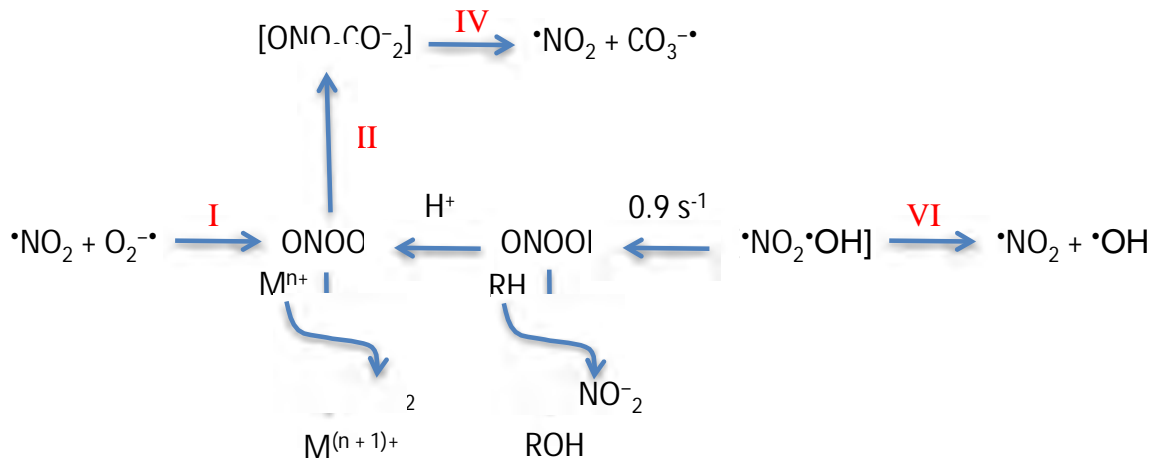


Figura 2. Principales rutas de formación y descomposición de peroxinitrito en sistemas biológicos. El peroxinitrito se forma en una reacción, controlada por difusión, de los radicales óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) y superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (I). El anión peroxinitrito (ONOO^-) puede reaccionar con metales de transición promoviendo oxidaciones de un electrón (II) o formar un aducto transitorio con el dióxido de carbono (III) para luego rendir radicales carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) y dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$) (IV). El ácido peroxinitroso (ONOOH) puede oxidar directamente sustratos (V) o descomponerse por ruptura a radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y ($\bullet\text{NO}_2$) (VI). Tomado de Radi y cols. 2001.

Dentro de la cadena bioquímica de reacciones de radicales libres, el camino que lleva de superóxido a hidroxilo se denomina vía de Fenton/Haber-Weiss. El óxido nítrico, al reaccionar con el superóxido, puede producir peroxinitrito y luego hidroxilo y constituir un segundo camino para llegar al hidroxilo, denominado vía de Beckman-Radi-Freeman. También hay un atajo que permite pasar de uno al otro. Por tanto, hay dos caminos: uno se inicia con superóxido y el otro con óxido nítrico y ambos llevan a la producción del radical hidroxilo (figura 3). En esta figura se muestra también el papel de la ubiquinona, presente en la matriz mitocondrial, para producir $\text{O}_2^{\bullet-}$ al reaccionar con $\bullet\text{NO}$ y ONOO^- , vía que se ha denominado como atajo de Cadenas-Poderoso. La reacción del óxido nítrico con ubiquinol produce ubisemiquinona, que también operaría como radical libre (Boveris y cols. 1999).

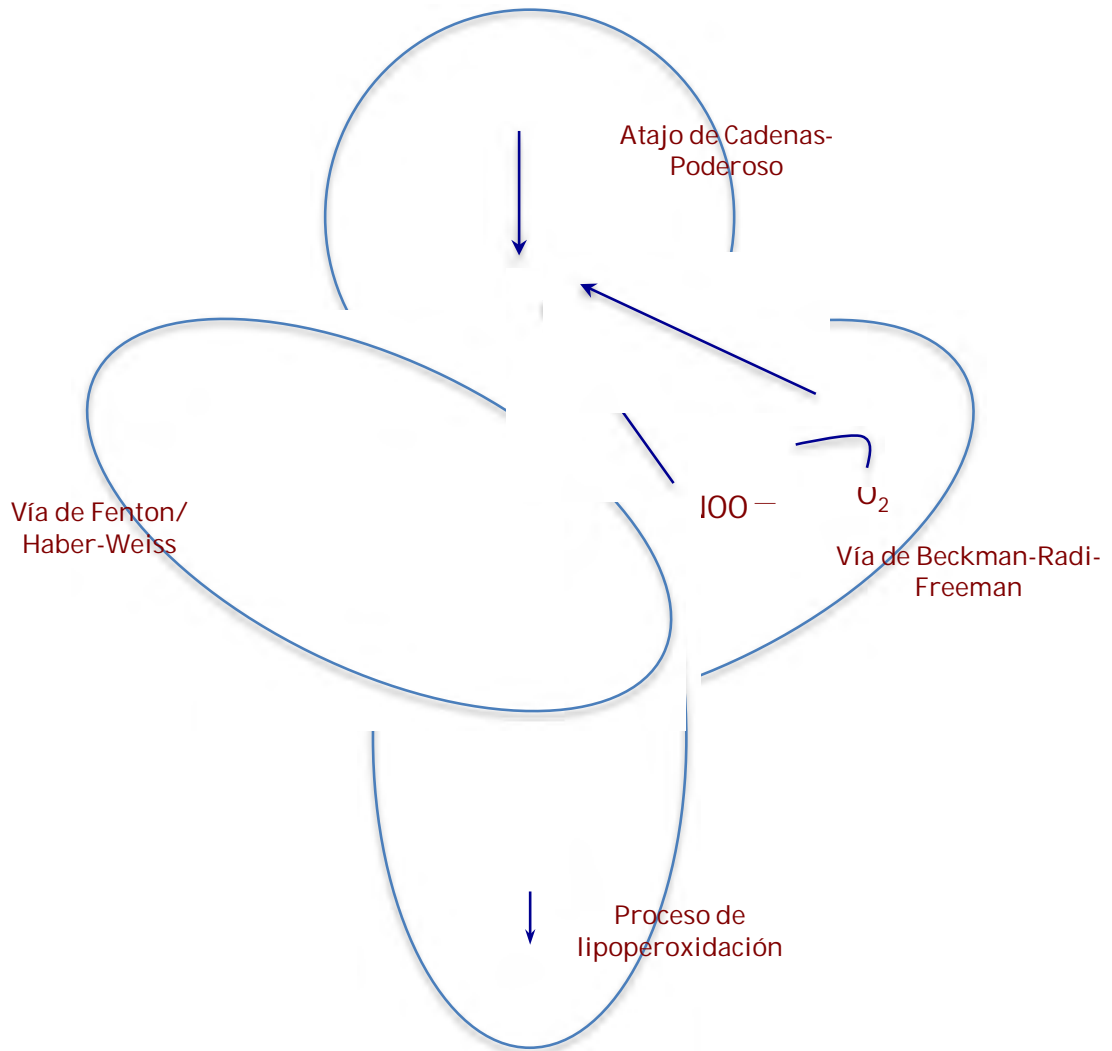


Figura 3. Reacciones de los radicales libres. La producción inicial de anión superóxido y de ácido nítrico conduce a la generación del radical hidroxilo, que inicia el proceso de lipoperoxidación. Tomado de Boveris, 2005.

II.2 Principales sistemas de defensa en la neutralización de radicales libres en los sistemas biológicos

Todos los organismos aeróbicos están expuestos continuamente al ataque de agentes oxidantes tanto exógenos como a los generados por el propio metabolismo celular. Es así que han desarrollado mecanismos a través de los cuales neutralizan el efecto de los radicales libres, ya sea a través de reacciones enzimáticas para su degradación, o bien con la síntesis de moléculas antioxidantes. El estrés oxidativo ocurre cuando la concentración de los oxidantes se incrementa por encima de la capacidad amortiguadora antioxidante de la célula.

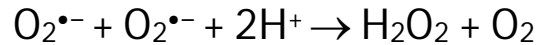
El sistema de defensa está constituido por un grupo de sustancias antioxidantes que aún cuando están presentes en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente su oxidación. Casi cualquier molécula de una célula se puede considerar como sustrato oxidable: proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. Los antioxidantes impiden que estas moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar o interactuar más rápido con las EROs que el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente -membrana plasmática, citosol, organelos, núcleo o medio extracelular.

El sistema de defensa antioxidante está constituido por varios componentes, que pueden ser clasificados en categorías. Los quelantes de metales representan la primera línea de defensa antioxidante, ya que estos compuestos, al secuestrar a los metales, impiden que catalicen las reacciones que dan lugar a la formación de radicales libres. A esta categoría pertenecen sustancias como la metalotioneína, ceruloplasmina, ferritina, transferrina y desferroxamina. Los compuestos de bajo peso molecular y las enzimas antioxidantes forman parte de la segunda línea de defensa celular. Estos compuestos desactivan a las EROs antes de que puedan dañar a las biomoléculas. En esta categoría se encuentran el ascorbato, el glutatión, el alfa-tocoferol y las enzimas superóxido dismutasas (SODs), catalasas y glutatiónpoxidadas (GPx) (figura 4). Finalmente, los sistemas de reparación representan la tercera y última línea de defensa antioxidante. Estos sistemas corrigen las modificaciones producidas en las biomoléculas dañadas por las EROs (Boveris y cols. 1999, Tanguy y cols. 2006).

II.2.1 Enzimas

El peróxido de hidrógeno se forma principalmente por la dismutación del superóxido, aunque también es producto de algunas oxidasas como la glucosa o la xantino oxidasa. Las células poseen una batería completa de enzimas para eliminar al peróxido: catalasas, catalasa-peroxidadas, peroxidadas y peroxirredoxinas. Los valores de K_M para estas enzimas difiere hasta en 4 órdenes de magnitud, lo que sugiere que las células deben de responder a grandes diferencias en la concentración de H_2O_2 : desde algunas catalasas monofuncionales con $K_M = 20 - 200$ mM hasta peroxirredoxinas, con $K_M = 20$ μ M (Domínguez y cols. 2010).

II.2.1.1 Superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1). Esta enzima descompone al radical superóxido convirtiéndolo en peróxido, de manera que convierte a un radical muy reactivo en uno menos reactivo:



En mamíferos, se han identificado cuatro clases de SOD: una de ellas utiliza dos átomos metálicos como cofactores, uno de Cu y otro de Zn. Las demás utilizan cofactores monoatómicos: Fe, Mn o Ni. Las FeSODs y las MnSODs son homólogas entre sí en cuanto a su secuencia y estructura tridimensional y poseen residuos quelantes idénticos en el sitio activo. Las otras superóxido dismutasas no están relacionadas a nivel estructural. Las SOD catalizan la rápida dismutación del superóxido mediante la oxidación y reducción sucesiva de un ión metálico de transición en el sitio activo por un mecanismo de ping pong.

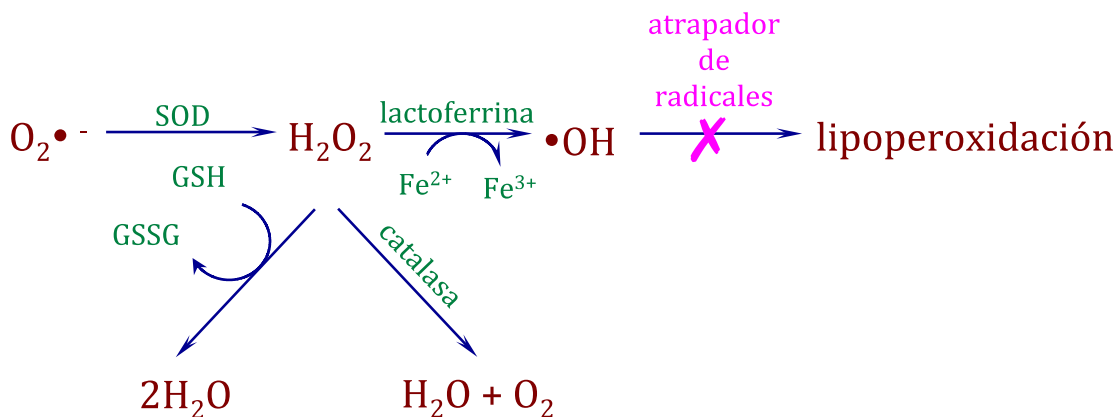


Figura 4. Entre los mecanismos de defensa contra el daño generado por las EROs, las células inducen la expresión de genes que codifican enzimas como la SOD, la catalasa y la glutatión peroxidasa, que eliminan muchas de las especies dañinas de oxígeno. La lactoferrina (que une hierro) y los atrapadores de radicales, como la vitamina E, también limitan el daño.

Las levaduras tienen dos tipos de SOD: La MnSOD, cuya localización es mitocondrial y la Cu/ZnSOD, de localización citoplasmática, de manera que se ha propuesto que la primera funcionaría para proteger a la mitocondria del $\text{O}_2^{\bullet-}$ generado durante la respiración, mientras que la segunda se encargaría de remover los radicales superóxido del citoplasma y probablemente también de los peroxisomas (Gralla y Vallentine 1991, Jamieson y cols. 1994)

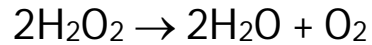
II.2.1.2 Glutación peroxidasa (GPx) (EC1.11.1.19): Se han caracterizado dos formas principales de GPx en las células: la GPx clásica (cGPx) y la glutación peroxidasa de fosfolipohidroperóxidos (PHGPx) (Inoue y cols. 1999). La primera es un homotetrámero, cada una de las subunidades que lo componen contiene un residuo de selenocisteína que es esencial para su actividad enzimática, mientras que la PHGPx es generalmente monomérica y se encuentra asociada a membranas; su papel es reducir los fosfolipohidroperóxidos esterificados en la membrana. Los fosfolipohidroperóxidos son intermediarios de la reacción de peroxidación lipídica y son responsables de la generación de EROs a este nivel y por tanto, del daño celular, y esta enzima los repara. Las GPx en conjunto comparten su sustrato con la catalasa, pero además pueden reaccionar de manera efectiva con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos (ROOH y H₂O₂) utilizando glutación reducido (GSH) que es transformado en glutación oxidado (GSSG) y así contribuyen a la protección de las células contra el daño oxidativo:



Se han encontrado al menos cinco isoenzimas de GPx en mamíferos. Aunque su expresión es ubicua, el nivel de cada isoforma varía dependiendo del tipo de tejido. La GPx citosólica ó mitocondrial (GPX1) reduce los hidroperóxidos de ácidos grasos y el H₂O₂ a expensas del glutación. La GPX4 se localiza tanto en la fracción citosólica como en la membrana. La GPX2 citosólica y la GPX3 extracelular se detectan escasamente en la mayoría de los tejidos, excepto en el tracto intestinal y el riñón, respectivamente. Recientemente se ha encontrado un nuevo miembro, la GPX5, que es independiente de selenio y se expresa específicamente en el epidídimo de ratón.

S. cerevisiae tiene tres isoenzimas de glutación peroxidasa de fosfolipohidroperóxidos (PHGPx). Es, hasta ahora, el único organismo conocido que tiene más de un gen que codifica PHGPx y, de manera muy interesante, es también el único organismo en el que no se ha encontrado actividad de cGPx (Avery y Avery 2001, Avery y cols. 2004).

II.2.1.3 Catalasa (EC 1.11.1.6): Es una enzima tetramérica, con cuatro subunidades idénticas de alrededor de 60 kDa, cada una de las cuales contiene un grupo de ferro-protoporfirina (cuatro por molécula). Las catalasas son las enzimas que catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Hörtner y cols. 1982):



En animales, el peróxido de hidrógeno es destoxificado mediante las actividades de la catalasa y la glutatión peroxidasa. Aunque la catalasa no es esencial para algunos tipos de células en condiciones normales, tiene un importante papel en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células. La catalasa captura el H_2O_2 antes de que pueda escapar de la célula y lo convierte en oxígeno molecular.

Estas enzimas ubicuas tienen un origen monofilético y se agrupan en tres clados: en el 1 están las de algas y plantas, en el 2 algunas de arqueas, bacterias y hongos y en el 3, otras de arqueas, bacterias y hongos más las de animales. Las catalasas pertenecientes a los clados 1 y 3 corresponden a enzimas cuyas subunidades son de 5-69 kDa mientras que las enzimas del clado 2 se componen por subunidades mayores, de 75-86 kDa (Zamocky y cols. 2008).

En *Saccharomyces cerevisiae* se ha demostrado la existencia de dos enzimas con actividad de catalasa. La primera, citoplasmática, juega un papel fundamental en la protección de esta levadura contra diferentes tipos de estrés y su transcripción es inducible. La otra, peroxisómica, se encarga de remover el H_2O_2 generado durante la β -oxidación de los ácidos grasos (Jamieson 1998).

II.2.1.4 Otras enzimas. En general, todas las enzimas involucradas en el ciclo redox de las células y las que generan poder reductor están involucradas en mantener las EROs bajo control, ejemplo de ellas son la ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11), la deshidroascorbato reductasa (EC 1.8.5.1), la glutatión reductasa (EC 1.6.4.2), la monodeshidroascorbato reductasa (EC 1.6.5.4), la glutatión-S-transferasa (EC 2.5.1.18), entre otras.

II.2.2 Mecanismos no enzimáticos

El glutatión es un tripéptido de γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina y es el mejor ejemplo de defensa no enzimática. El GSH actúa como un atrapador, posee un grupo sulfhidrilo que reacciona con los oxidantes y se produce glutatión oxidado (GSSG). El glutatión es posiblemente la molécula atrapadora de intermediarios reactivos de oxígeno más abundante en la célula. En consecuencia, su papel en el mantenimiento del estado redox celular es importante.

Las poliaminas, derivadas de los aminoácidos, también han sido implicadas en la protección contra el estrés oxidativo. Las poliaminas actúan como antioxidantes al atrapar diversas EROs y en especial al radical superóxido. De hecho la espermina y la espermidina son esenciales para el crecimiento aeróbico de *S. cerevisiae*.

El ácido eritroascórbico muestra propiedades antioxidantes similares al ácido ascórbico, es decir, actúa como un buen agente reductor al reaccionar con el radical hidroxilo, con el superóxido y con el H_2O_2 . Aunque el ácido eritroascórbico ha sido identificado en las levaduras, su papel específico no ha sido esclarecido.

Las metalotioneínas son proteínas pequeñas, ricas en cisteína que tienen la capacidad de unir ciertos iones metálicos. Entre las funciones de las metalotioneínas se incluye el almacenamiento de los metales en una forma no tóxica, inaccesible para la producción de otras EROs por la reacción de Fenton.

Las tiorredoxinas son un grupo de proteínas pequeñas que facilitan la reducción de otras proteínas a través de un intercambio tiol/disulfuro, debido a que poseen un dominio conservado con dos cisteínas vecinas, cuyos grupos SH actúan como agentes reductores con la acción de la tiorredoxina peroxidasa y la ribonucleótido reductasa.

II.3 Regulación genética de la respuesta al estrés oxidativo en levaduras

La síntesis de los componentes antioxidantes en las células tiene que ser muy bien regulada en tiempo y espacio, ya que ante un estrés oxidativo inducido por un metal pesado como el hierro, se requiere de proteínas diferentes a aquellas que responden a un estrés oxidativo inducido por el anión superóxido o el peróxido de hidrógeno (Jones 2008). Componentes diferentes deberán ser activados en proporciones diferentes. Como se ha mencionado de manera reiterada, los organismos aeróbicos están constantemente expuestos al ataque de las EROs y han desarrollado diferentes estrategias para contender con ellas; sin embargo cuando la presencia de radicales libres sobrepasa la capacidad antioxidante de la célula, se presenta el estrés oxidativo (figura 5) (Scandalios 2002). La respuesta al estrés oxidativo ha sido ampliamente estudiada tanto en procariontes como en eucariontes. En bacterias, en particular en *Escherichia coli* y en *Salmonella typhimurium*, se ha caracterizado principalmente a los regulones OxyR y SoxR/S. Cuando las células son expuestas a peróxido de hidrógeno, los residuos de cisteína del factor de transcripción OxyR se oxidan, cambiando su conformación. Por lo tanto, el factor OxyR puede asumir dos conformaciones que dependen de la oxidación de una cisteína crítica: solamente la forma oxidada de OxyR es capaz de unirse a los promotores de los genes que regula. Consecuentemente, la expresión de los genes regulados por este factor solamente se presenta ante la exposición al peróxido de hidrógeno. En este caso es interesante señalar que una sola proteína sensa el estímulo biológico (tratamiento con peróxido de hidrógeno) y activa la respuesta celular. El regulón OxyR regula la transcripción de genes cuyos productos están involucrados en la descomposición de peróxidos, tales como los que codifican para catalasa, alquil hidroperóxido reductasa y glutatión reductasa (Storz y cols. 1999).

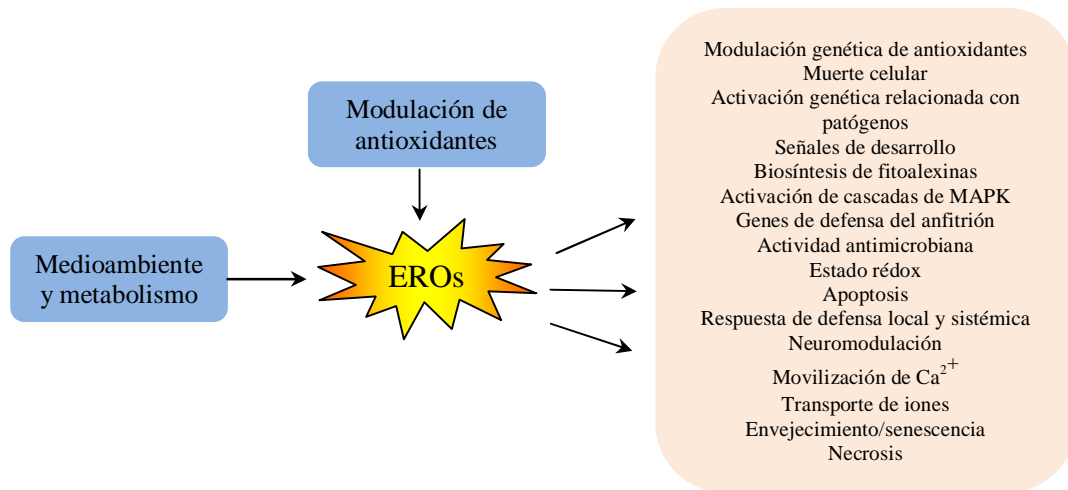


Figura 5. Las EROs cumplen papeles importantes que se manifiestan de manera pleiotrópica. Cuando la presencia de las EROs sobrepasa la capacidad antioxidante de la célula sobreviene el estrés oxidativo. Tomado de ^aScandalios, 2002.

El regulón SoxR/S es otro regulón de bacterias, que contiene genes que se activan por anión superóxido. En este caso, dos proteínas median la respuesta al estrés por superóxido: SoxR y SoxS. SoxR es una proteína que contiene hierro-azufre y que se oxida por anión superóxido. La forma oxidada de SoxR se une al promotor de SoxS, activando su transcripción. La proteína SoxS es un factor de transcripción que se une a los promotores de los genes del regulón SoxRS, muchos de cuyos productos están involucrados en la descomposición del anión superóxido (Shull y cols. 1991).

Las especies reactivas de nitrógeno pueden también activar regulones en bacterias. Tanto el peroxinitrito como los nitroso tioles son capaces de activar a la proteína OxyR, mientras que el óxido nítrico induce al regulón SoxR/S. Así, parece ser que la respuesta a diferentes tipos de estrés oxidativo no es totalmente diferente en bacterias. De hecho, la expresión de grupos de genes es regulada por más de un regulón e incluso algunas proteínas de choque calórico también son inducidas por estrés oxidativo, indicando la existencia de una superposición entre regulones de distintos tipos de estrés (Storz y cols. 1999).

Con respecto al estrés oxidativo en eucariontes, la mayoría del conocimiento se ha obtenido mediante el estudio de este fenómeno en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

La regulación de la respuesta antioxidante en *S. cerevisiae* ocurre mayoritariamente a nivel de la transcripción. Al igual que en el caso de bacterias, hay una superposición considerable entre las respuestas provocadas ante una condición de estrés oxidativo y aquellas observadas en distintas condiciones de estrés, como las provocadas por la falta de nutrientes, por el calor, el choque osmótico y la resistencia a metales pesados como el cadmio (Folch-Mallol y cols. 2004). Esto sugiere que las diversas condiciones de estrés generan conjuntamente una condición hiperoxidante. De esta manera, se han identificado varios de los factores transcripcionales que regulan la expresión genética en respuesta al estrés oxidativo y su actividad, en muchos casos, se modula por las vías de señalización de diferentes condiciones de estrés (Moye-Rowley 2002).

Utilizando el análisis fenotípico de mutantes más sensibles que la cepa silvestre al estrés oxidativo, se comenzó por identificar factores de transcripción involucrados en la respuesta al estrés oxidativo en esta levadura. Se ha descrito a YAP-1 como uno de los factores de transcripción involucrados en la respuesta celular ante un aumento en la concentración de peróxidos. La eliminación del gen Yap1 produce células mutantes menos resistentes a los peróxidos, y se ha demostrado que tienen niveles muy reducidos de enzimas con actividad antioxidante como la SOD y la glutatión reductasa. Más aún, este factor de transcripción parece regular la expresión de varias proteínas de la vía biosintética del glutatión y de la vía de las pentosas. De manera similar a lo que ocurre con el factor OxyR en procariontes, Yap-1 es oxidado mediante la formación de un puente disulfuro intramolecular, lo que provoca un cambio conformacional que le permite entonces activar a los genes blanco. La formación del puente disulfuro ocurre sólo en presencia de H₂O₂, y se ha demostrado que no es este compuesto el que oxida al factor directamente, sino que la tiol peroxidasa, Gpx3, es el sensor que en presencia de esta ERO provoca la oxidación de Yap1, que entonces funciona como activador transcripcional (Delaunay y cols. 2002).

SKN-7 es otro factor de transcripción asociado con la respuesta al estrés oxidativo. Como en el caso de la delección de Yap-1, la eliminación de Skn-7 conduce a una hipersensibilidad a los peróxidos. Más aún, SKN-7 también regula la expresión de

genes que codifican para las proteínas antioxidantes como catalasa (*CTT1*), citocromo c peroxidasa (*CCP1*), tiorredoxina 2 (*TRX2*) y varias otras. El hecho de que un determinado gen sea regulado por más de un factor de transcripción, sugiere que la respuesta al estrés oxidativo en los eucariontes es muy compleja (Jaekwon y cols. 1999). Por ejemplo, en la levadura, la activación de un residuo aspartato del factor SKN-7 está relacionada con la respuesta al estrés osmótico y con la división celular, sin embargo no se sabe si SKN-7 actúa en la misma forma en la respuesta al estrés oxidativo y al osmótico.

Se ha abordado de manera global la inducción de genes a través de ensayos de microarreglos como respuesta a diferentes estímulos, incluyendo desde luego, el estrés oxidativo, así como también el perfil proteico general mediante electroforesis en doble dimensión (Jaekwon y cols. 1999). En este último enfoque, se sometieron levaduras a un estrés por H₂O₂ en un medio conteniendo ³⁵S – metionina, de manera que las proteínas sintetizadas durante el período de inducción con H₂O₂ fueron marcadas radioactivamente. Utilizando este abordaje, se identificaron 115 proteínas inducidas por peróxido de hidrógeno, 12 de las cuales fueron identificadas como proteínas antioxidantes. Se observó que durante el estrés oxidativo, el metabolismo de carbohidratos es reprogramado: la cantidad de enzimas involucradas en la vía glucolítica se encuentra disminuida, mientras que la cantidad de enzimas involucradas en la vía de las pentosas está aumentada. Los autores sugieren que estos cambios son una estrategia de las células para obtener más NADPH para los procesos reductores. Más aún, estos autores identificaron un gran conjunto de proteínas en las cuales la inducción de peróxido de hidrógeno fue mediada por YAP-1, SNK-7 o por ambos.

La otra estrategia global es analizar los patrones de expresión genómica de *S. cerevisiae* expuesta a peróxido de hidrógeno y a otros tipos de estrés. Con este tipo de análisis, se ha mostrado que 2/3 partes del genoma está involucrado en la respuesta a cambios ambientales en general y se han identificado genes que se inducen y/o reprimen como respuesta a cada cambio ambiental (Gash y cols. 2000). La respuesta al estrés oxidativo involucra a alrededor de una tercera parte del genoma de la levadura. La expresión después de tratamientos con peróxido y superóxido es

prácticamente idéntica: a pesar de que son EROs diferentes, se observa una fuerte inducción de los genes involucrados en la detoxificación de ambas especies: catalasas, superóxido dismutasas y glutatión peroxidadas, así como de otros genes involucrados en reacciones oxidativas y reductivas, como tiorredoxinas, glutatión reductasas y glutarredoxinas (Koleva y cols. 2008).

Asimismo, la expresión general de los genes de la levadura ha sido monitoreada durante los diferentes estadios del desarrollo, esto es, desde la fase exponencial hasta la estacionaria (DeRisi y cols. 1997). Estos autores mostraron que la mayoría de los genes que codifican para proteínas antioxidantes aumentan su expresión en las últimas fases del desarrollo, lo cual se correlaciona con las mayores concentraciones de EROs en células que se encuentran en fase de crecimiento estacionaria.

En eucariontes superiores, la respuesta a estrés oxidativo es aún más compleja, estaría regulada por más efectores, pero se conoce muy poco. En células de mamíferos, los factores NF- κ B y AP-1 han sido propuestos como involucrados en la regulación de la respuesta al estrés oxidativo, sin embargo no se ha logrado demostrar que regulen la síntesis de alguna enzima antioxidante. NF- κ B, por ejemplo, regula el metabolismo y el crecimiento, y su expresión aumenta en respuesta a un estrés oxidativo (Li y Karin 1999). En cambio, se ha propuesto la presencia del elemento ARE en varios promotores de mamíferos como el de la glutatión-S-peroxidasa, metalotioneína I y en los genes de la MnSOD al que se debe de unir un factor que aún no ha sido identificado. Estos tres factores también parecen participar en la respuesta a estrés oxidativo en plantas superiores.

Se conocen los componentes ascendentes de la vía que conduce a la activación de AP-1. Esta vía involucra al transporte de electrones, que finaliza con la reducción de AP-1 y la activación de la expresión genética. El primer componente de esta vía es el NADPH, que reduce a la tiorredoxina en una reacción catalizada por la flavoproteína tiorredoxina peroxidasa. La tiorredoxina transfiere entonces los electrones a ref-1, una endonucleasa que también está involucrada en la reparación del DNA. Finalmente, ref-1 reduce a AP-1 que se dimeriza para así activar la expresión genética. Otras vías

pueden también conducir a la activación de AP-1, tales como la fosforilación provocada por la proteína cinasa C. A diferencia del AP-1, el factor NF- κ B parece ser activado por oxidación en lugar de reducción. El NF- κ B existe en el citosol como trímero. La fosforilación u oxidación de una de sus subunidades conduce al NF- κ B hacia el núcleo, en donde se une al DNA y estimula la expresión genética.

II.4 ¿Cómo se produce el peróxido de hidrógeno en la β -oxidación?

La degradación de los ácidos grasos se puede considerar la función principal de las reacciones oxidativas que se llevan a cabo en los peroxisomas. Durante la β -oxidación, las cadenas aciladas de los ácidos grasos son acortadas de manera secuencial en bloques de dos átomos de carbono por vez, convirtiendo finalmente a los ácidos grasos en acetil-CoA. Entonces el acetil-CoA es exportado desde los peroxisomas al citosol para utilizarlo en las reacciones de biosíntesis. En células de mamíferos, la β -oxidación se lleva a cabo tanto en mitocondrias como en peroxisomas, pero en plantas y levaduras, estas reacciones esenciales ocurren sólo en los peroxisomas (van Roermund y cols. 1998).

La oxidación peroxisómica difiere de la β -oxidación mitocondrial en la reacción de deshidrogenación inicial (figura 6). En los peroxisomas, una flavoproteína-deshidrogenasa transfiere los electrones al O_2 , produciendo H_2O_2 , en lugar de capturar a los electrones de alta energía en forma de $FADH_2$ como ocurre en el proceso mitocondrial. La catalasa presente en los peroxisomas, se utiliza entonces para descomponer al peróxido de hidrógeno producido en esta reacción inicial, en agua y oxígeno. Las etapas siguientes son idénticas a su contraparte mitocondrial, aunque las llevan a cabo isoformas enzimáticas distintas (Hiltunen y cols. 2003).

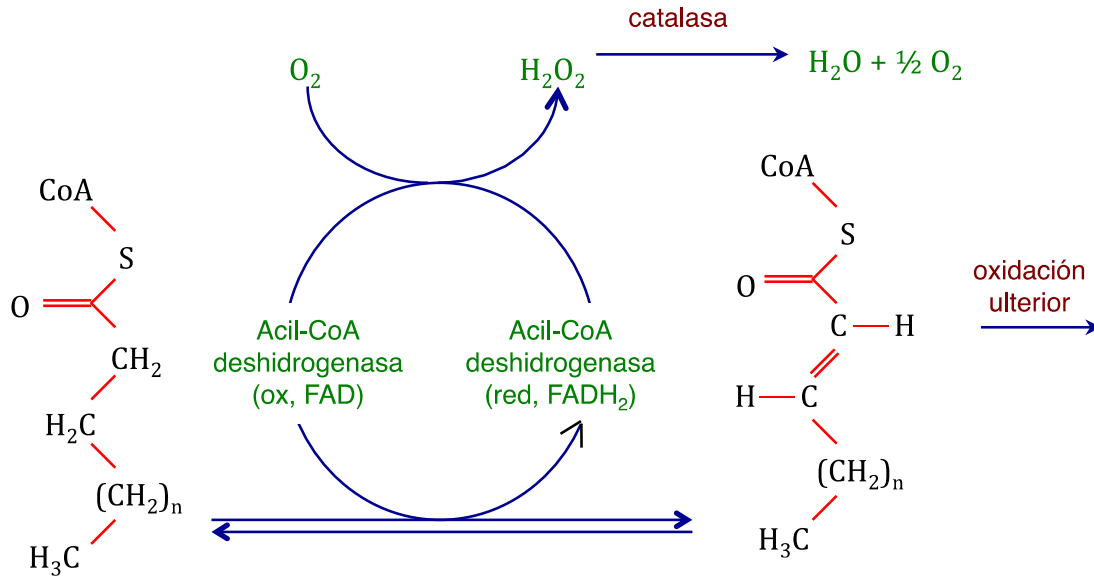


Figura 6. Iniciación de la degradación de los ácidos grasos en el peroxisoma. La primera deshidratación de la degradación peroxisómica de los ácidos grasos es catalizada por una flavoproteína-deshidrogenasa que transfiere electrones al O_2 y produce H_2O_2 .

II.5 Las catalasas de *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene dos catalasas: La catalasa T, que es soluble y se localiza en el citoplasma, y la catalasa A que es una enzima peroxisómica (Zimniak y cols. 1976). Los genes que codifican para ambas enzimas ya han sido clonados y secuenciados. La catalasa A está codificada por *CTA1* (Cohen y cols. 1985) que se encuentra en el cromosoma 4: un segmento de DNA de 2786pb, con un ORF de 515 aminoácidos, cuya estructura ya fue cristalizada (Maté y cols. 1999); mientras que la catalasa T está codificada por *CTT1* (Hartig y Ruis, 1986), localizado en el cromosoma 7, de 2642pb y un ORF de 562 aminoácidos. La catalasa T debe su nombre a Típica, mientras que la catalasa A es por Atípica. La mayor parte de los genes que se han identificado que codifican para catalasa en otros organismos, muestran una mayor identidad con *CTA1* que con *CTT1*. Se han reportado organismos con múltiples genes de catalasa, como *Aspergillus nidulans*, que tiene al menos cuatro, que se

expresan de manera diferencial en las distintas etapas del desarrollo (Kawasaki y Aguirre 2001, Kawasaki y cols. 1997). Otros hongos, como *Candida albicans*, tienen sólo un gen que codifica para catalasa y su expresión parece ser importante para su patogenicidad (Wysong y cols. 1998). Se ha propuesto que en *S. cerevisiae* la catalasa A funciona en la detoxificación del H₂O₂ producido durante la β -oxidación de los ácidos grasos ya que esa es la fuente primaria de peróxido de hidrógeno en los peroxisomas (Jamieson 1998, Hiltunen y cols. 2003), y en la del que se genera en las mitocondrias por la acción de las superóxido dismutasas *Sod1* y *Sod2* en la defensa contra las EROs (Sturtz y cols. 2001). Se ha demostrado que la actividad de *Cta1* es importante durante el estrés oxidativo para la protección de proteínas en contra de la inactivación oxidativa (Kurita 2003, Luschak y Gospodaryov 2005). Se sabe que su actividad se incrementa durante la restricción calórica y durante condiciones de estrés oxidativo provocados por el envejecimiento, adaptación al estrés ácido e inducción de termotolerancia (Agarwal y cols. 2005, Giannattasio y cols. 2005, Davidson y cols. 1996)

La catalasa A es un homotetrámero con un grupo hemo y un sitio de unión de NADP(H) en cada subunidad (Maté y cols. 1999). La transcripción del gen que la codifica está regulada en respuesta a ácido oleico, glucosa, hemo y oxígeno (Skoneczny y Rytka 2000, Rytka y cols. 1978, Hortner y cols. 1982). La transcripción es mediada por los activadores transcripcionales *Adr1*, *Oaf1*, *Rtg1* y *Rtg2* a través de la unión de éstos a los elementos ORE y UAS1 que están sobrelapados en su promotor (Chelstowska y Butow, 1995, Gurvitz y cols. 2001).

Por su parte, la catalasa T está involucrada en la protección contra varios tipos de estrés, como choque calórico, envejecimiento (Fabrizio y cols. 2004), choque osmótico (Schüller y cols. 1994), desecación (Braga y cols. 2005), choque oxidativo (Zimniak y cols. 1976) y choque frío (Aguilera y cols. 2007).

Ninguno de los dos genes es esencial para el crecimiento de esta levadura (Cohen y cols. 1985, Spevak y cols. 1983). Hasta hace poco, el único fenotipo reportado de la delección de cada uno de los dos genes que codifican para catalasas, era la incapacidad de estas cepas mutantes de inducir resistencia a cantidades de peróxido en las que la cepa silvestre puede subsistir si ha sido tratada previamente en

condiciones de activación (un choque calórico mediano o una concentración subletal de H₂O₂). Una mutante sin catalasa (Izawa y cols. 1996) muestra un crecimiento análogo al de la cepa silvestre en condiciones sin estrés oxidativo y exhibe una susceptibilidad similar a la de las mutantes sencillas en la adaptación al estrés por H₂O₂, en la fase de crecimiento exponencial. Sin embargo, en fase estacionaria la doble mutante es mucho más sensible al estrés por H₂O₂ que la cepa silvestre y que cada una de las mutantes sencillas, lo que implica, además, que en cada mutante sencilla el producto del otro gen (normal) la hace menos susceptible a este estrés. Otros autores (Lushchak y Gospodaryov 2005) han demostrado que la actividad de catalasa es más de 10 veces mayor al cultivar a *S. cerevisiae* en un medio que contiene etanol en lugar de glucosa como fuente de carbono, y esto se debe a que en etanol la levadura exhibe una fuerte respuesta de activación de las enzimas de la respuesta antioxidativa (Luschak 2006). De hecho, se ha propuesto que la toxicidad del etanol se debe a la generación de EROs en las mitocondrias, además del daño físico provocado por la desnaturalización de proteínas y la pérdida de la fluidez de la membrana (Piper 1995). Se ha encontrado que el gen que codifica a la N-acetil transferasa, Mpr1, estaría involucrado en contender con el estrés mediado por etanol porque reduce los niveles intracelulares de EROs (Du y Takagi 2007), se propone que acetilando directamente al peróxido en el citoplasma.

Por otro lado, se ha reportado que el gen *CTT1* de *S. cerevisiae* tiene en su promotor un elemento tipo STRE (*Stress Response Element*) (Schüller y cols. 1994; Marchler y cols. 1993). A través de este elemento de 13pb, se activa la expresión de *CTT1* como consecuencia de diferentes condiciones estresantes, como son la falta de nitrógeno, la fase de crecimiento estacionaria (por la escasez de nutrientes), la presencia de peróxido de hidrógeno e incrementos en la osmolaridad del medio circundante. La proteína *Ctt1* se produce en respuesta tanto a choque calórico como choque osmótico y se sabe que esta inducción ocurre sólo a través del elemento STRE. Así, estos autores proponen que la catalasa T juega un importante papel en la protección contra el estrés osmótico e incluso provoca una protección cruzada que le da resistencia al mismo estrés osmótico, al producirse como resultado de un choque calórico no letal, en el cual no interviene la activación mediada por *HOG* (*High*

Osmolarity Glycerol). De hecho, encuentran inducción de la actividad de catalasa, inducción del mRNA de *CTT1* y actividad de β -galactosidasa (gen reportero bajo el control del promotor de *CTT1*), como respuesta a NaCl 0.3 M (mediado por *HOG*), pH 2.8, sorbato 5 mM, benzoato 5 mM, H₂O₂ 0.4 mM y 7.5% de etanol, todo esto en una cepa sin *CTA1*. De manera que el efector de STRE no es necesariamente un producto de *HOG*, ya que, excepto en el caso del choque osmótico, la activación provocada por otros tipos de estrés no es mediada por este sistema y se presenta aún en una mutante carente de *HOG1* (Shenton y cols. 2006). Finalmente, proponen que la expresión de *CTT1* produce una catalasa que permite a la célula contender con un estrés severo, de manera que, así como *HSP104* es un inductor de termotolerancia (Sánchez y cols. 1990), *CTT1* sería un inductor de osmotolerancia.

Está bien establecido que para contender con el estrés oxidativo, las levaduras se adaptan a través de alterar su patrón global de transcripción, incluyendo a los genes que codifican a las enzimas antioxidantes. Además responden también acudiendo a complejos mecanismos regulatorios que incluyen la inhibición global de la traducción. Así, la exposición al H₂O₂ resulta en la rápida y reversible inhibición de la síntesis de proteínas (Shenton y cols. 2006) y esto conlleva a recurrir a los mRNAs y proteínas existentes mientras que se reprograma la expresión génica para contender con el estrés (Mascarenhas y cols. 2008).

II.6 *Debaryomyces hansenii* como modelo

Debaryomyces hansenii es una levadura que fue aislada originalmente del mar (Norkrans 1966), clasificada como una de las denominadas "levaduras no convencionales" (Spencer y cols. 2002). En la Naturaleza se la puede encontrar en suelos, en frutos y maderas en descomposición (Prista y cols. 2005). *Debaryomyces hansenii* es una levadura criotolerante (resistente al frío) y puede prevalecer en niveles de sal de hasta 24% (4.3 M de NaCl). Asimismo, su osmotolerancia la hace importante para muchos procesos agroalimentarios. Es la levadura más comúnmente encontrada en todos los tipos de queso; otras levaduras suelen prevalecer en variedades particulares de queso; en cambio ésta está presente en todos (Fleet 1990). *D. hansenii* aporta sus actividades proteo y lipolíticas para la maduración de los

quesos. También es común en lácteos y salmueras por su capacidad de crecer en sal y bajas temperaturas (Seiler y Busse 1990) y metaboliza ácidos láctico y cítrico (Guerzoni y cols. 1993).

Debido a su fuerte potencial biotecnológico (Breuer y Harms 2006, Ochoa y Vázquez-Juárez 2004), cada vez se pone más de manifiesto la importancia de comprender la fisiología de este microorganismo. Esta levadura eurihalina (capaz de proliferar en un medio que puede contener con un amplio rango de salinidades) produce xilitol a partir de xilosa (Sampaio y cols. 2008, Converti y Domínguez 2001), tiene propiedades lipo y proteolíticas (Martín 2002), tiene una extrema capacidad para sintetizar, acumular y almacenar lípidos, por lo que se la clasifica como oleaginosa (Breuer y Harms 2006), exhibe respiración resistente a cianuro (Veiga y cols. 2003), es capaz de crecer en medios con cadmio y otros metales pesados (Seda-Miró y cols. 2007) y en la presencia de éstos incrementa su producción de riboflavina a niveles útiles para la industria (Voronovski y cols. 2004) representando así un organismo provechoso no sólo en la producción de consumibles sino también en la biorremediación (Sarri y cols. 2009).

Su genoma ha sido completamente secuenciado (Lepingle y cols. 2000) La secuencia genómica de *D. hansenii* CBS767 reveló la presencia de 7 cromosomas que van de 1.25 Mb a 2.33 Mb, con un tamaño total de 12.2 Mb. De entre todas las levaduras, *D. hansenii* parece tener la mayor capacidad codificante, con un 79.2% del genoma ocupado en marcos de lectura abiertos (ORF, Open Reading Frames) encontrándose 6,906 posibles secuencias codificantes. Además, tiene el genoma más reiterado, con una redundancia del 49.2% [<http://www.genolevures.org/deha.html>] (Dujon y cols. 2004, Sherman y cols. 2009). Curiosamente, los transportadores de alantoato son las proteínas más representadas en este genoma.

El grupo francés de genolevures (<http://www.genolevures.org>) secuenció y comparó el genoma de cuatro levaduras hemiascomicetas: *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii* y *Yarrowia lipolytica*. Fueron seleccionadas por su posición filogenética y por su importancia como patógenos para el humano, o bien por su importancia industrial o ambiental (Sherman y cols. 2009).

Los estudios evolutivos mostraron que las cuatro levaduras tienen diferentes mecanismos de sexualidad; así, *Y. lipolytica* tiene un ciclo haplo-diplóntico (que alterna entre las fases haploide y diploide y ambas tienen la misma importancia), mientras que *D. hansenii* es una levadura homotálica con un ciclo de vida esencialmente haploide. Las dos levaduras tienen un solo locus de tipo de apareamiento, mientras que las otras dos tienen dos, α y β , parecidos a los de *S. cerevisiae* (Mahoney y Broach 1989).

Los análisis filogenéticos indican que el género *Debaryomyces* no es monofilético y que *D. hansenii* define a uno de los cuatro clados de este género (Kurtzman y Robnett 1998). Hay dos variedades: var. *hansenii* y var. *fabryi*, la segunda mucho menos caracterizada. *D. hansenii* pertenece al clado más grande de especies de levaduras donde están la mayoría de las *Candida* spp y *Pichia* spp. Desde un punto de vista filogenético, *D. hansenii* está más cercanamente relacionada con la especie patógena *Candida albicans*, con la que comparte muchas características y también cercana a levaduras clasificadas formalmente como *Schwanniomyces*, como *Debaryomyces (Schwanniomyces) occidentalis*.

D. hansenii utiliza un código genético alternativo, ya que el codón CUG, que en el código genético universal significa leucina, en esta levadura -como en *C. albicans*-, es leído por un tRNA-Ser especial y único (anticodón CAG).

A pesar de ser un organismo tan versátil e interesante, *Debaryomyces hansenii* ha sido muy poco estudiada. Hay fuertes limitaciones para llevar a cabo manipulación genética clásica: no ha sido posible hacer cruces, debido a que es homotálica de ciclo primordialmente haplonte. Por esa misma razón no se tienen mutantes auxotróficas, por tanto no hay posibilidad de llevar a cabo complementaciones genéticas y no se ha logrado transformar. Existen algunos reportes en los que se informa de la aplicación de estas técnicas moleculares (Maggi y Govind, 2004; Minhas, y cols. 2008), sin embargo estas estrategias no han podido ser reproducidas ni los mismos autores las han continuado. Recientemente, se logró sobreproducir FMN utilizando a esta levadura flavogénica, que sobreproduce riboflavina si se cultiva en un medio deficiente en hierro (Yatsyshyn y cols. 2009). Se obtuvo una cepa de *Candida famata*

(su anamorfo) con inserciones cromosómicas en multicopia del gen que codifica a la flavinmononucleótido cinasa de *D. hansenii*, logrando una producción de 200-250 mg/l de FMN en sobrenadantes de cultivos optimizados para ser de alta densidad; sin embargo, se acumulan grandes cantidades del precursor riboflavina en el medio (Krauss y cols. 2010). Estos autores utilizaron mutagénesis insercional y previamente habían demostrado que la inserción mediante esta técnica ocurre al azar (Dmytruk y cols. 2006). Se ha reportado también que *D. hansenii* tiene dos tipos de plásmidos lineales, cuya estabilidad depende, al menos para uno de ellos, de una alta presión osmótica (Gunge y cols. 1993, Cong y cols. 1994). Esto es algo que prácticamente no se menciona en ningún artículo y que nosotros no hemos logrado comprobar.

Cuando esta levadura crece en condiciones de alta osmolaridad, los niveles de las sales intracelulares no son suficientes para balancear la presión del medio (Norkrans, 1969, Thomé-Ortiz y cols. 1998). De este comportamiento se han identificado algunas características fisiológicas: la producción de glicerol y arabitol como solutos compatibles en respuesta a este incremento en la concentración extracelular de sal (Nobre y da Costa 1985); el sistema de transporte para asegurar la homeostasis del glicerol (Lucas y cols. 1990) y la participación del metabolismo del carbono asociada con esta producción (Blomberg y Adler 1993). También se ha demostrado que el Na⁺ no es tóxico, ya que presenta crecimiento aún en presencia de altas concentraciones intracelulares de este catión (Prista y cols. 1997, Thomé-Ortiz y cols. 1998). Cuando *D. hansenii* es cultivada en medios con alto contenido de sales, incrementa su capacidad de contender con agresiones de agentes abióticos (Guerrero y cols. 2005, Gori y cols. 2007, Papouskova y Sychrova 2007, Sánchez y cols. 2008). En *Debaryomyces hansenii*, a diferencia de lo que ocurre en todos los demás organismos que han sido analizados, el incremento en la presencia de cationes monovalentes, como Na⁺ y K⁺, provoca que el canal mitocondrial se cierre (MUC, Mitochondrial Unspecific Channel), impidiendo la permeabilidad transicional y evitando así el libre flujo de iones dentro y fuera de la matriz mitocondrial (Cabrera-Orefice y cols. 2010).

D. hansenii está siendo utilizada para metabolizar el glicerol crudo que se obtiene de la producción de biodiesel. Este combustible para motores, que se produce utilizando fuentes renovables como grasa animal y aceites vegetales, es una atractiva

alternativa al uso de combustibles derivados del petróleo (Krawczyk 1996). En la producción de biodiesel que utiliza la transesterificación de triglicéridos, el principal co-producto es el glicerol: El glicerol refinado tiene gran utilidad en la industria de la alimentación, farmacéutica, textil y cosmética -por cada 9 kg de biodiesel se obtiene cerca de 1 kg de glicerol (Dasari y cols. 2005). El glicerol tiene poco valor debido a impurezas como sales, metanol y metil ésteres residuales y ácidos grasos libres (Liu y cols. 2002; Bournay y cols. 2005). La levadura es capaz de transformarlo en arabitol y xilitol, que se utilizan como endulzantes hipocalóricos, reductores de caries, ya que las bacterias lo metabolizan formando arabitol fosfato que resulta en compuestos que inhiben su metabolismo (Lin y Li 2011).

II.6.1 ¿*Debaryomyces hansenii* es una levadura halófila o eurihalina?

La variedad de ambientes en los que pueden proliferar las levaduras, las hacen organismos extraordinariamente interesantes para analizar la forma en la que llevan a cabo cambios metabólicos: ¿cómo una misma especie puede adaptarse a ambientes tan distintos como el agua de mar o un fruto seco en descomposición (Gasch y cols. 2000; Spencer y cols. 2002, Botha 2006).

Las levaduras han emergido además como agentes patógenos para el ser humano. Con el advenimiento de nuevos tratamientos contra el cáncer, el incremento en el uso de catéteres venosos, el uso indiscriminado de agentes antibacterianos y en general el aumento en la expectativa de vida y otros logros de la medicina, las levaduras, antes consideradas inocuas, ahora se reconocen como causantes de severas infecciones (Nucci y Marr 2005, Paiva y Pereira 2007, Krauke y Sychrova 2010).

Un organismo puede ser simultáneamente halófilo y eurihalino, esto es, puede proliferar en ambientes con diferentes concentraciones de sales y preferir aquellos que tienen una concentración alta de sal. Organismos que sólo pueden vivir en un rango muy limitado de salinidad son estenohalinos, término que corresponde al antónimo de eurihalinos. Sin embargo, como se discutirá a lo largo de este trabajo, *D. hansenii* es una levadura eurihalina; ciertos hallazgos la colocan como halófila, aunque desde nuestro punto de vista no es claro que prefiera habitar ambientes salinos y la presencia de NaCl constituye un estrés para esta levadura.

II.6.2 La ubicua *Debaryomyces hansenii*

Una de las levaduras más interesantes, debido a la variedad de sitios en los que se la ha encontrado, es *Debaryomyces (Torulaspora) hansenii* y su anamorfo *Candida famata* (Nishikawa y cols. 1996, Ochoa y Vázquez-Juárez 2004). Es un microorganismo capaz de crecer en alimentos tan salados como salmueras, queso y jamón y tan ricos en azúcar como mermeladas, incluso si estos alimentos son conservados en refrigeración (van der Walt y cols. 1977, Tokuoka y cols. 1985). La han identificado creciendo en salsa de soya, colonizando un ambiente con un pH muy alcalino, de 9.0, pero también es capaz de metabolizar ácidos, por ejemplo el láctico y el cítrico; de hecho, puede crecer en un muy amplio rango de acidez/alcalinidad (pH = 3.6 - 10.0) (Kurita y Yamazaki 2002, Kuda y cols. 2009). Asimismo, fue encontrada en el mar, en donde la concentración de sal puede llegar hasta 24% (4.0 M de NaCl) y a profundidades marinas tan grandes como 50 metros, en donde las condiciones fisicoquímicas ambientales son muy distintas a las que prevalecen en la superficie de una salchicha (Norkrans 1966, Yancey y cols. 1982). También se ha reportado que puede sobrevivir en presencia de metales pesados, pesticidas e hidrocarburos aromáticos (Gaad y Edwards 1986, Jayasree y Saramma 1996). Incluso se ha obtenido como parásito de peces (Solntseva y cols. 1987) y ha emergido como un oportunista en los humanos (Thiers y cols. 1960, Wong y cols. 1982, Yamamoto y cols. 2002, Bourke y cols. 2003): entre otros procesos, recientemente se reportó el caso de una mujer mayor que presentaba alveolitis alérgica extrínseca; se descubrió que la infección pulmonar era debida a *D. hansenii* y al buscar la fuente, se encontró que provenía de un humidificador ultrasónico que la paciente empleaba en su habitación en el que había crecido esta levadura.

Al igual que otras, *D. hansenii* secreta un producto polipeptídico tóxico para otras especies de levaduras del mismo género, denominado "killer", que también puede inhibir el crecimiento de bacterias. Lo interesante es que la toxina de *Debaryomyces* sólo es funcional si la levadura es cultivada en presencia de sal, pH relativamente ácido y temperatura relativamente fría (<20 °C) (Marquina y cols. 2001, Beatriz Rodarte y trabajo de nuestro grupo).

La diversidad de microhábitats colonizados por esta especie, sugiere la existencia de distintas subpoblaciones que se han ido adaptando específicamente a esos nichos. Por ejemplo, algunas cepas europeas no fermentan azúcares, sin embargo, especímenes obtenidos en Brasil han mostrado ser sumamente eficientes para fermentar (Veiga y cols. 2000, Converti y Domínguez 2001, Veiga y cols. 2003, Sánchez y cols. 2006, Kręgiel 2008).

II.6.3 *Debaryomyces* en la biotecnología

El aroma de las frutas, los jugos y el vino se debe a la presencia de los terpenos, sobre todo del tipo de los monoterpenoles, que en las frutas están unidos a β -glucopiranosas ligadas a azúcares. Estas uniones son liberadas por β -glucosidasas endógenas de la fruta durante la maduración, sin embargo, estas enzimas no tienen la capacidad de catalizar la liberación de todas las moléculas. Por ello, se han buscado fuentes alternativas de β -glucosidasas (Fia y cols. 2005). *D. hansenii* produce de manera constitutiva una β -glucosidasa extracelular que no se reprime ni se inhibe por la presencia de etanol ni glucosa, ni es influenciada por el pH ácido o por las bajas temperaturas, por lo que el uso de esta levadura puede ayudar a mejorar el sabor y el olor de estos productos (Fernández-González y cols. 2003, Caridi y cols. 2005).

La fermentación alcohólica espontánea del mosto de uva es un proceso llevado a cabo por la acción de levaduras pertenecientes a diferentes géneros y especies (Fleet y Heard 1993). Las levaduras de bajo poder fermentativo crecen durante las etapas iniciales de las fermentaciones; cuando la concentración de etanol se incrementa, las levaduras más tolerantes a este compuesto, pertenecientes al género *Saccharomyces*, completan la fermentación (Flores y cols. 2000, Fia y cols. 2005).

D. hansenii puede ser un contaminante en la fermentación de vinos y cervezas si domina a la cepa industrial, dando lugar a un producto espurio. Sin embargo, se está utilizando actualmente en la industria vinícola como cepa iniciadora de la fermentación, gracias a su actividad "killer", que serviría para eliminar a otras levaduras indeseables (Fia y cols. 2005, Jolly y cols. 2006). Al aumentar la cantidad de etanol como producto de la fermentación, *D. hansenii* deja su lugar a la productora del

vino por excelencia: *Saccharomyces cerevisiae* (Loureiro y Malfeito-Ferreira 2003, Lopes y cols. 2007).

Las levaduras constituyen la causa más probable de alteración de productos tales como frutas y bebidas sin alcohol, debido a que éstos contienen azúcares fermentables, así como de la descomposición de productos en los que la elevada acidez, la baja actividad de agua o la presencia de alcohol, inhiben el desarrollo bacteriano, por lo que se asocian también con el deterioro de frutas secas, de productos cárnicos madurados como salchichas y jamones, productos lácteos como quesos frescos y madurados, helados, salmueras, etc (Loureiro y Malfeito-Ferreira 2003).

Debaryomyces hansenii es el contaminante más común de todos los quesos madurados y del jamón serrano (Prillinger y cols. 1999). Sin embargo, dado que en general se considera como un organismo no tóxico para los humanos, se utiliza como organismo "iniciador" de los procesos de fermentación en la producción de alimentos madurados que son condimentados (Bjørn Sørensen 1996), ya que se desarrolla en la presencia de grandes cantidades de sal, tiene propiedades proteolíticas y lipolíticas e impide el crecimiento de otros organismos. Debido a que su proliferación se inhibe por los ácidos hidroxycinámicos, presentes en ajo, canela, cebolla, clavo, orégano, pimienta, tomillo, al sazonar estos alimentos, la levadura deja de crecer (Loureiro y Malfeito-Ferreira 2003, Takaç y Sengel 2010).

El sabor dulce tiene en la vida humana mucha importancia, contribuyendo al placer de comer. Se han desarrollado edulcorantes distintos al obtenido del azúcar de caña, como el xilitol, que se obtiene a partir de la xilosa. Este edulcorante no requiere de insulina para ser asimilado, por lo que se utiliza para preparar alimentos para diabéticos (dulces, mermeladas, chocolates, etc) (Domínguez 1998). Es un producto que no produce caries ya que no es metabolizado por los microorganismos que las generan. No siendo un substrato para la placa dental no acidifica la cavidad bucal, por lo que también se manufacturan chicles y caramelos endulzados con este edulcorante. *D. hansenii* excreta grandes cantidades de xilitol cuando es cultivada en xilosa (Converti y Domínguez 2001, Rivas y cols. 2009).

Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*

Cepas de *Debaryomyces hansenii* aisladas del mar, han manifestado otra propiedad interesante: producen una enzima antioxidante, la superóxido dismutasa (Cu-Zn SOD) en grandes cantidades (Hernández-Saavedra y Ochoa 1999, Ochoa y Vázquez-Juárez 2004). Esta enzima es un antioxidante natural que actúa eliminando los radicales libres generados durante la respiración de todos los organismos aeróbicos. Esta enzima pudiera también funcionar como un quelante (atrapador) de metales pesados, sumamente tóxicos (Bartosz 2005). Extractos obtenidos de *D. hansenii* que expresa Cu-Zn SOD ya se están utilizando para la producción de cremas faciales y otros cosméticos (García-González y Ochoa 1999, Ochoa y Latisnere-Barragán 2006).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debaryomyces hansenii, en su hábitat natural, está expuesta a altas concentraciones de sales que generarían gran cantidad de EROs. Para contender con estas condiciones, esta levadura marina incrementa sus niveles de superóxido dismutasa a niveles extremadamente altos (Hernández-Saavedra y cols. 1997), lo que generaría gran cantidad de peróxido que, indudablemente, debe de ser descompuesto en especies de menor reactividad. *D. hansenii* tendría que haber desarrollado sistemas de protección que le permitan adaptarse a diversas condiciones de estrés, que no están presentes en organismos sensibles como *S. cerevisiae*, ya que este último sólo puede responder de manera transitoria -pero no logra adaptarse-, por ejemplo, a una concentración alta de osmolitos en el medio (Bansal y Mondal 2000, Ramos 2005). Por ello, es necesario identificar los mecanismos que permiten a *D. hansenii* contender con el estrés oxidativo al adaptarse a la presencia de sal en el medio de cultivo.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas y medios de cultivo: Las cepas utilizadas en este trabajo fueron *Saccharomyces cerevisiae* S288C y *Debaryomyces hansenii* Y7426. El medio rico YPD consistió en extracto de levadura 1%, peptona de caseína 2% y glucosa 2%. Para medio sólido se agregó agar al 2%. Cuando se utilizó medio rico YP y fuentes no fermentables de carbono, éstas fueron etanol, metanol y glicerol, siempre al 2% (v/v). El NaCl se añadió de acuerdo a la molaridad indicada (p/v). El MM Difco contiene sales, vitaminas, elementos traza, glucosa al 2% como fuente de carbono y NH_2SO_4 como fuente de nitrógeno. El medio SN se muestra en el siguiente cuadro y contiene sales, vitaminas, elementos traza, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , K_2SO_4 , Na_2SO_4 , glucosa al 2%, asparagina 7.5 mM como única fuente de nitrógeno. Cuando se utilizó medio SN Asn y fuentes no fermentables de carbono, éstas fueron etanol (EtOH), metanol (MetOH) y glicerol, siempre al 2% (v/v). El NaCl se añadió de acuerdo a la molaridad indicada (p/v) y para medio sólido se añadió agar al 2%.

Composición, por litro, del medio de cultivo SNAsn para <i>Debaryomyces hansenii</i>	
^a Sales 50X	20 ml
^b Vitaminas 1000X	1 ml
^c Trazas 1000X	1 ml
Glucosa	20 gr
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	160 mg
KH_2PO_4	350 mg
Na_2SO_4	280 mg
K_2SO_4	340 mg
NaCl (para 1M)	58.4 g
[*] Asn 7.5 mM	1.14 g
Se mezclaron todos los reactivos menos la asparagina, se aforó a 1 L con agua y se esterilizó en autoclave a 121 °C a 1.2 atm de presión por 20 min. Una vez frío, se añadió la Asn esterilizada por filtración.	

^a Solución stock de sales 50X para MM Difco de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Fosfato monobásico de potasio	50 g
Sulfato de magnesio	5 g
Cloruro de sodio	1 g
Cloruro de calcio	1 g
H_2O	1,000 ml
Se filtró por papel Whatman No. 43 y se guardó en botella ámbar a 4 °C	

Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*

b Solución stock de vitaminas 1000X para MM Difco de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Biotina	2 mg
Pantotenato de calcio	400 mg
Ácido fólico	2 mg
Niacina	400 mg
Ácido p-aminobenzoico	200 mg
Piridoxina-HCl	400 mg
Riboflavina	200 mg
Tiamina-HCl	400 mg
Inositol	400 mg
H ₂ O	1,000 ml
Se guardó en alícuotas de 30 ml a -20 °C	

c Solución stock de elementos traza 1000X para MM Difco de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Ácido bórico	500 mg
Sulfato cúprico	40 mg
Yoduro de potasio	100 mg
Cloruro férrico	200 mg
Sulfato manganoso	400 mg
Molibdato de sodio	200 mg
Sulfato de zinc	400 mg
H ₂ O	1,000 ml
Se guardó en botella ámbar a 4 °C	

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico o biología molecular.

Mantenimiento de las cepas y condiciones de cultivo. *D. hansenii* se mantuvo siempre en cajas de YPD – 0.6 M NaCl y *S. cerevisiae* en YPD; ambas cepas eran resembradas una vez por semana para contar siempre con inóculo fresco. En todos los experimentos, se hicieron precultivos en medio rico YPD con o sin sal según se indique, con el fin de que todas las células estuvieran sincronizadas al momento de ser inoculadas en los medios experimentales. Siempre, los precultivos crecidos por 1 – 3 noches a 30 °C, fueron centrifugados, lavados 1 ó 2 veces con H₂O estéril, resuspendidos en H₂O en un volumen mínimo e inoculados en los medios experimentales a una DO_{600nm} = 0.05.

Curvas de crecimiento. Las curvas de crecimiento se realizaron tomando 1 ml del cultivo en crecimiento cada determinado tiempo para medir la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro, haciendo las diluciones pertinentes si era necesario. El tiempo de duplicación se obtiene calculando la pendiente de la fase exponencial de crecimiento graficando en papel semilogarítmico la D.O._{600nm} en el eje de las ordenadas vs tiempo en el eje de las abscisas.

Obtención de extractos crudos. Los extractos crudos se obtuvieron tomando las muestras del tiempo y cultivo deseados, se centrifugaron, lavaron 1 ó 2 veces con H₂O estéril y se resuspendieron en el amortiguador de extracción especificado para cada

técnica. Se transfirieron a tubos de vidrio, se añadieron $\sim \frac{3}{4}$ de volumen de perlas de vidrio de 800 – 1,200 μ y se rompieron en vórtex agitando 1 min x 1 min de reposo en hielo, 5 veces. Las muestras se centrifugaron para eliminar los restos celulares y los extractos crudos quedaron listos para hacer las determinaciones explicadas más adelante.

Determinación de la concentración de proteínas totales. La concentración de proteínas se calculó mediante la técnica de Bradford, Quick Start Bradford Protein Assay de BioRad, que se basa en la formación de un complejo entre el azul brillante de Coomassie G-250 y las proteínas que absorbe a 595 nm. Se usaron diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino como estándar.

Actividad específica de catalasa. Los extractos crudos se prepararon en el amortiguador de extracción adecuado: buffer de fosfatos (sodio) 0.05 M, pH 7.0. La actividad específica se determinó modificando lo reportado por Beers y Sizer (1952) y Aebi (1980). Una alícuota (entre 1 y 50 μ l) de extracto crudo es añadida a 2.9 ml de buffer de ensayo en una cubeta de cuarzo de 3 ml. Se mezcla bien y se arranca la reacción añadiendo 100 μ l de sustrato (H_2O_2 500 mM, para una concentración final de 16.6 mM). Se agita rápidamente y se coloca en el espectrofotómetro, en donde se sigue el decaimiento en la absorbancia a 240 nm por 3 minutos. La actividad de catalasa se calcula obteniendo la velocidad de descomposición del peróxido, que es proporcional a la reducción en la A_{240nm} . La actividad específica se obtiene al normalizar con el contenido total de proteína en la muestra, expresándose en unidades por miligramo de proteína:

Actividad específica = $mmin/\epsilon/mg$ de proteína, en donde

$mmin$ = pendiente por minuto del decaimiento en la A_{240nm}

ϵ = Coeficiente de extinción molar = 0.0394 M/cm (Nelson y Kiesow, 1972)

Con el fin de corroborar los resultados de la actividad de catalasa determinada en el espectrofotómetro, se empleó un método alternativo, en el que se mide la velocidad inicial en la producción de oxígeno molecular, utilizando un microelectrodo de Clark (Rørth y Jensen, 1976). La reacción se inició inyectando 5 μ l o menos del extracto

crudo en una cámara sellada que contiene 2 ml de H₂O₂ 10 mM en buffer de fosfatos 10 mM, pH 7.8. Las unidades se definen como μmoles de O₂ producido por minuto por miligramo de proteína resultados. A través de este análisis pudimos probar que la actividad de catalasa determinada por cualquiera de estos métodos reflejaba de manera similar los resultados obtenidos.

Ensayos de sensibilidad al H₂O₂. Con el fin de analizar la viabilidad celular en respuesta a un choque con peróxido de hidrógeno, se prepararon tubos de ensaye que contenían medio YPD con y sin 0.6 M de NaCl y entre 0 y 30 mM de concentración de H₂O₂. Los tubos fueron inoculados a DO_{600nm}= 0.5 con levaduras que fueron colectadas de cultivos crecidos hasta fase exponencial o estacionaria e incubados por 180 minutos a 30 °C con agitación vigorosa. Tras el choque con este estrés oxidativo, los tubos fueron centrifugados para eliminar el medio con peróxido y las células de la pastilla obtenida fueron resuspendidas en agua, ajustando nuevamente la DO_{600nm} a 0.5. Las muestras resultantes fueron diluidas de manera seriada y cada dilución fue sembrada en cajas de Petri con medio YPD sólido. Las cajas se incubaron a 30 °C por 5 días. Este protocolo fue adaptado del reportado por el grupo del Dr. Alejandro de las Peñas (Cuéllar-Cruz y cols. 2008).

Obtención del RNA total. Fueron probados diversos métodos, como extracción con fenol-cloroformo-isoamílico (Carlson y Botstein, 1982), fenol caliente (Köhler y Domdey, 1991), tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi 1987), etc. Sin embargo, se estaba buscando preparar RNA a partir de cultivos en fase estacionaria, en los que la degradación de este ácido nucleico es alta. Finalmente, logramos adoptar la extracción precipitando al RNA con cloruro de litio y utilizando ácido aurintricarboxílico (ATA) como inhibidor de las nucleasas (Hallick y cols. 1977). Todos los reactivos fueron preparados con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). Se inocularon las células de *D. hansenii* precultivadas en YPD – 0.6 M de NaCl a 0.05 de DO_{600nm} en YPD, YPD – NaCl, YPE y YPE – NaCl y se incubaron a 30 °C con agitación vigorosa hasta alcanzar la fase exponencial o la estacionaria. Se vaciaron 15 ml del cultivo en tubos cónicos estériles de 15 ml que contenían 300 μl de azida de

Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*

sodio (NaN_3) 1.0 M mantenidos en hielo y se mezcló por inversión. Los tubos se centrifugaron a 3,000 rpm por 7 minutos. Se descartaron los sobrenadantes y las pastillas fueron resuspendidas en 1 ml de NaN_3 20 mM y transferidas a microtubos, que fueron centrifugados rápidamente y decantados. Entonces el paquete celular fue resuspendido en 100 μl de NaN_3 20 mM y se le añadieron 200 μl de fenol equilibrado a pH 8.0, 100 μl de buffer ATA de lisis y \approx 0.3 g de perlas de 800 – 1,200 μ lavadas con ácido y esterilizadas. Las muestras fueron agitadas vigorosamente en el vórtex por 3 minutos, tras lo que se añadieron 200 μl de LET 1X, se mezcló y centrifugó a 13,000 x *g* durante 15 minutos a 4 °C. Se transfirieron los sobrenadantes a microtubos nuevos y el RNA fue precipitado al añadir un volumen de etanol absoluto helado. Las muestras se congelaron por al menos 1 hora, tras lo cual fueron centrifugadas y el RNA precipitado lavado con etanol 70 % - DEPC para finalmente resuspender las pastillas en ATA 1 mM.

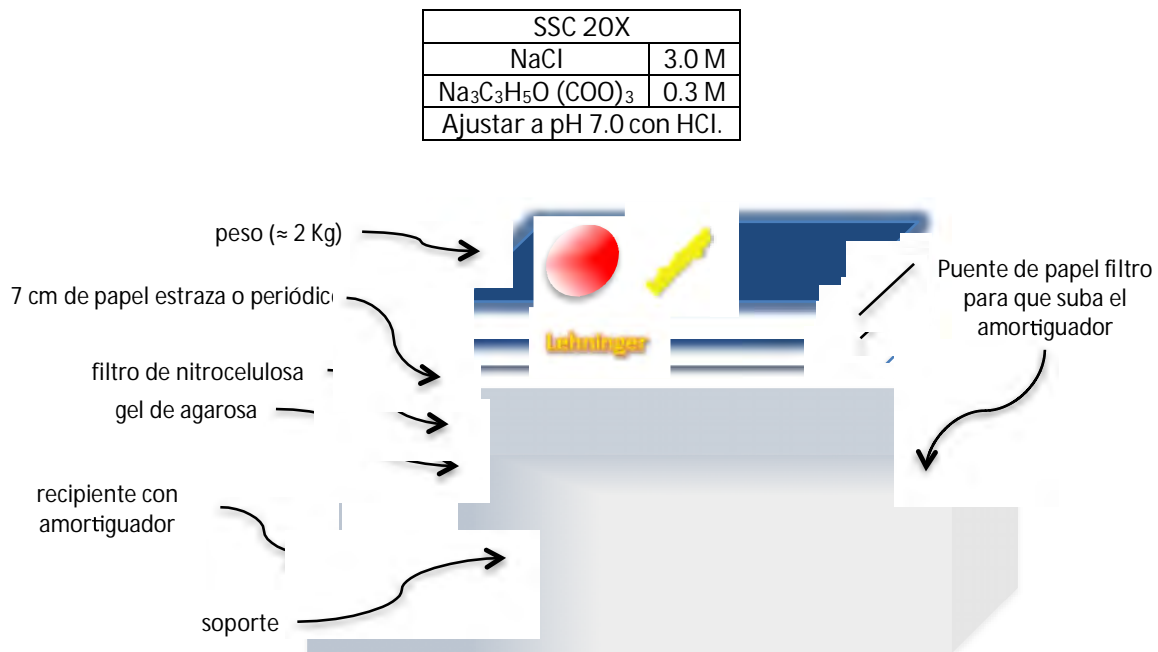
Buffer LET 5 X	
LiCl	50 mM
DTT	100 mM
Tris, pH 7.4	0.5 M

Electroforesis de RNA. Se prepararon geles de agarosa al 1.5 % con formaldehído al 2.2 % en MAE 1X. Como amortiguador de corrida se usó buffer MAE 1X con 1.1 % de formaldehído. Las muestras se prepararon de la siguiente manera: en microtubo se colocaron \approx 20 μg de RNA, buffer de carga 1.25 X y bromuro de etidio 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se incubó a 56 °C por 15 minutos y se cargó el gel. Se corrió la electroforesis 4 h a 200 V y el RNA se observó con luz UV.

Buffer MAE 10X	
MOPS	200 mM
NaOAc	50 mM
EDTA	10 mM
Ajustar pH a 7.0 con NaOH. Esterilizar por filtración y almacenar a 4 °C en botella ámbar	

Buffer de carga 1.25X	
Formamida	2.2 ml
Formaldehído	800 μl
MAE 10X	500 μl
Glicerol 80%	400 μl
Azul de bromofenol 2%	100 μl
Resultan 4 ml. Almacenar a – 20 °C	

Transferencia del gel de RNA. El gel se lavó 2 veces por 20 minutos en SSC 10X para eliminar el formaldehído. Se colocó el gel encima de un filtro Whatman 3MM que se acomodó sobre un vidrio apoyado encima de una cámara y comunicado mediante tiras de papel filtro con el buffer de transferencia (SSC 10X). Sobre el gel se colocó el filtro de Hybond N⁺ cortado exactamente del mismo tamaño del gel, encima de él 2 – 3 filtros de papel Whatman y después 7.5 cm de servilletas de papel absorbente. Hasta arriba se puso un vidrio y sobre él un libro de ≈ 2 Kg. Se dejó transfiriendo por 14 horas. Se comprobó la transferencia mediante la observación del RNA en el filtro usando el transiluminador de luz UV. La membrana se lavó con SSC 1X, se dejó secar y se fijó por entrecruzamiento con luz UV (0.12 joules a 254nm).



Amplificación por PCR. El diseño de los *cebadores* y las condiciones de amplificación se incluyeron en resultados.

Marcaje de las sondas. Se marcaron los fragmentos obtenidos del PCR con α -³²P-dCTP utilizando el kit de Prime-It II Random Primer Labeling, de Agilent Technologies, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Hibridación. Se prehibridó la membrana con el RNA incubándola por 1 hora en buffer de prehibridación. Se cambió el buffer al de hibridación y se añadió una de las sondas radiactivas recién marcada y calentada por 10 minutos a 95 °C y se dejó interaccionando por 18 h a 65 °C. Se recuperó y almacenó la sonda radiactiva y el filtro se lavó 2X con SSC 1X – SDS 1% y 2X con SSC 0.2X – SDS 1%, cada lavado por 30 minutos a 65 °C. La señal se cuantificó tras una exposición de 2 – 16 horas (según la intensidad de la señal) utilizando un Typhoon 840 e ImageQuant TL.

Buffer de hibridación (PSE)	
Buffer de fosfato de sodio 1 M, pH 7.2	300 mM
SDS	7 %
EDTA	1 mM
El buffer de prehibridación no lleva SDS	

Lavado exhaustivo para la reutilización del filtro. Para eliminar perfectamente la sonda radiactiva y así poder hibridar el mismo filtro, se hierve SDS al 0.1% y se sumerge el filtro. Se deja hasta que se enfríe a temperatura ambiente y se repite máximo una vez.

Purificación de la catalasa. La catalasa se purificó a partir de un cultivo en fase estacionaria en 3,000 ml de YPE. Se adaptaron los protocolos de Aebi (1984) y de Trindade y cols. (1988). Se prepararon los extractos crudos en buffer de fosfato de sodio 50 mM pH 7.0 y se llevó a cabo una precipitación fraccional con sulfato de amonio (NH_2SO_4). La fracción en donde quedó la actividad fue la de 40 – 70% de saturación. Esta fracción fue dializada en buffer de fosfato de sodio 50 mM pH 7.0 y fue aplicada a una columna de extracción molecular de Sephacryl HR100. Se juntaron los tubos que retuvieron la actividad, se concentraron en una membrana de diálisis usando polietilenglicol y se aplicó la muestra a una cromatografía de interacción hidrofóbica de fenilsefarosa CL – 4B, usando NH_2SO_4 1.7 M – buffer de fosfato de sodio como amortiguador de unión. Se lavó pasando un gradiente de NH_2SO_4 desde 1.7 M hasta 0 en buffer de fosfatos y se eluyó la muestra con el buffer de fosfatos ya sin sal,

siguiendo la absorbancia a 280 nm de las fracciones eluidas. Se juntaron las fracciones con actividad y se concentraron en una membrana de diálisis usando polietilenglicol hasta concentrar a ≈ 0.2 mg/ml de proteína y se almacenó a 4 °C.

Electroforesis de proteínas (PAGE, Polyacrilamide Gel Electrophoresys, Laemmli 1970). Se hicieron geles tanto desnaturalizantes, en los que se rompió toda estructura proteica de orden superior, como geles nativos, en los que se conserva la estructura cuaternaria de la catalasa. Ambas electroforesis se llevaron a cabo de la misma manera, con la diferencia de que para la nativa no se utilizó ningún agente desnaturalizante (SDS) ni se hirvió la muestra antes de aplicarla. Se hicieron geles separadores de poliacrilamida-bis-acrilamida al 7.5 % y al 12 % con concentradores al 4% .

Solución A: 30% acrilamida: 0.8 % N´N´-bis-metilen-acrilamida (30:0.8). Disolver, filtrar y guardar en frasco ámbar a 4 °C.

Solución B: Tris-HCl 1.5 M pH 8.8
Ajustar el pH con HCl 1.0 M, guardar a 4 °C

Solución C: Tris-HCl 0.5 M pH 6.8
Ajustar el pH con HCl 1.0 M, guardar a 4 °C

Solución D: SDS 10%

Solución E: Buffer de carga 4X: Tris HCl pH 6.8 300 mM
Glicerol 100 mM
Azul de bromofenol
*2-mercaptoetanol
*SDS 7.5%

Solución F: Buffer de corrida 5X: Glicina 1.92 M
Tris-base,
*SDS

* Sólo para geles y condiciones desnaturalizantes. Para geles nativos, NO se agregaron los agentes marcados con asterisco y se sustituyó el volumen con agua

Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*

Preparación de PAGE				
Solución	Gel nativo		Gel desnaturalizante	
	Separador 12%	Concentrador 4%	Separador 12%	Concentrador 4%
H ₂ O	3.45 ml	3.0 ml	3.35 ml	2.95 ml
A	4.0 ml	665 µl	4.0 ml	665 µl
B	2.5 ml	-	2.5 ml	-
C	-	1.25 ml	-	1.25 ml
D	-	-	100 µl	25 µl
PSA 10%	100 µl	50 µl	100 µl	50 µl
TEMED	25 µl	10 µl	25 µl	10 µl

Se preparó el gel separador y se vació entre los vidrios colocados en el sistema portador de la cámara Miniprotean 3 de BioRad, dejando 3 cm de la parte superior libre. Con una pipeta Pasteur, se cubrió completamente la sección superior con isopropanol. Se dejó polimerizar por al menos 40 minutos. Se preparó el gel desnaturalizante y justo antes de iniciar la polimerización (antes de añadir PSA y TEMED), se vació el isopropanol. Se llenaron los vidrios hasta arriba con el gel separador y cuidadosamente se colocó el peine. Una vez solidificados los geles en los vidrios en el sistema portador, se armó la cámara Miniprotean 3 de BioRad y se cargaron las muestras: cuando se trataba de geles nativos sólo amortiguador de muestra (sin SDS) y $\approx 20 \mu\text{g}$ totales de proteína del extracto crudo; si se trataba de geles desnaturalizantes entonces se hervían las muestras ya preparadas con buffer de carga por 10 minutos. Los geles fueron corridos muy lentamente (a 12 V) durante 22 – 26 horas a 4 °C, en buffer de corrida.

Tinción de los geles. Para observar de las proteínas se empleó una solución de azul de Coomassie:

Solución teñidora de Coomassie	
Ácido acético	10 %
Metanol	40 %
Azul de Coomassie G-250	0.1 %
Disolver y aforar a 100 ml con H ₂ O	

Solución desteñidora	
Ácido acético	10 %
Metanol	40 %
Disolver y aforar a 100 ml con H ₂ O	

Los geles fueron lavados con agua desionizada de 30 a 60 segundos y se colocaron en la solución de tinción durante 1 - 2 horas. Pasado este tiempo fueron desteñidos hasta obtener un fondo claro.

Tinción para observar la actividad de catalasa (Woodbury y cols. 1971). Los geles se lavaron con agua de la llave por 30 a 60 segundos y se incubaron en una solución de H₂O₂ 100 mM por 15 minutos. Mientras, se preparó una solución 1:1 de ferricianuro de potasio:cloruro férrico, c/u al 1% (para ello, se pesaron y disolvieron en 50 ml de agua cada uno por separado y se mezclaron justo antes de usar). Transcurrida la incubación del gel con el sustrato, se eliminó el H₂O₂ y se lavó tres veces con agua de la llave. Se escurrió lo mejor posible y se añadió la solución de tinción. Se agitó suavemente vigilando hasta que el gel se tiñó completamente de azul oscuro y se vieron las bandas con actividad de catalasa como zonas sin color. Se descartó la solución teñidora y se enjuagó varias veces con agua. El gel se conservó por varios meses en una bolsa de plástico a 4 °C.

Determinación de parámetros cinéticos y efecto de inhibidores. Con el fin de determinar algunos parámetros catalíticos con la enzima purificada, se mezcló 1 µg de la enzima pura con 2.9 ml de buffer de fosfatos 50 mM y se disparó la reacción con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (0 – 100 mM) (Mozaffar y cols. 1986). Se determinó la actividad de catalasa midiendo la descomposición del peróxido a 240 nm. Se utilizó la velocidad inicial para calcular la actividad específica. El pH óptimo se determinó en buffer de fosfato de potasio de 4.0 a 8.5 de pH. Los valores aparentes de las constantes cinéticas como V_{max} y K_M se obtuvieron mediante el cálculo a través de las gráficas de Lineweaver-Burk y Eadie Hofstee.

Se analizó también el efecto de distintos inhibidores reportados sobre la actividad de la catalasa, añadiendo concentraciones crecientes de NaCl, 3-amino-1, 2, 4-triazol (3-AT) (Havir 2003, Price y cols. 1961), NaN₃ y etanol (Johnston y Delwiche 1965, Putnam y cols. 2000), en un ensayo usando una concentración constante de enzima a pH 7.0. Se incubó por 5 minutos en presencia del inhibidor y la reacción se arrancó por la adición de 16.6 mM de H₂O₂ y se siguió el decaimiento de la A_{240nm}.

Espectrometría de masas en tándem (LC/ESI-MS/MS) Esto lo llevó a cabo el Dr. Guillermo Mendoza Hernández en el laboratorio de de la Facultad de Medicina de la UNAM. La banda de proteína purificada fue extraída del gel con SDS teñido con Coomassie; fue desteñida, después reducida, se carbamidometiló, se lavó y finalmente se digirió con tripsina porcina modificada. La extracción se hizo como se describe en Xolalpa y cols. (2007). Los análisis de espectrometría de masas del péptido se hicieron usando un espectrómetro de masas de hibridación en tándem 3,200 Q TRAP equipado con una fuente iónica de nanoelectroaerosol (NanoSpray II) y una cabeza MicroIonSpray II. El instrumento fue acoplado en línea con un sistema nanoAcquity Ultra Performance LC. El espectro obtuvo los datos de modo automatizado usando Information Dependent Acquisition (IDA). Los iones precursores se seleccionaron en Q1 usando el modo MS aumentado (EMS) para la exploración. El EMS fue seguido por una exploración de resolución aumentada (ER) de los tres iones más intensos a baja velocidad, de 250 amu/seg, para determinar el estado de carga iónica y después por una exploración de producto iónico (EPI). Los iones precursores se fragmentaron por disociación activada por choque (CAD) en una celda de colisión Q2. Los iones fragmentados generados fueron capturados y analizados en una trampa iónica lineal Q3.

La identificación proteica se realizó mediante la búsqueda de los datos del espectro MS/MS utilizando MASCOT (version 1.6b9, disponible en <http://www.matrixscience.com>). Se permitió una tolerancia de 0.5 Da y 0.3 Da para las masas iónicas del precursor y del fragmento, respectivamente. La modificación constante fue la carbamidometilcisteína y se permitió hasta un corte erróneo por tripsina. La búsqueda se realizó en la sección *Fungi* de la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov>).

Bioinformática. Se utilizaron las siguientes bases de datos: SDB (<http://www.yeastgenome.org/>), National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.kegg.com>), PEDANT (<http://www.pedant.gsf.de/>), Génolevures:

Genomic Exploration of the Hemiascomycete Yeasts: (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/>). Se identificaron, mediante BLAST, los ortólogos de *ScCTA1* y de *ScCTT1*. Además, se tomaron aquellas especies que presentaban parálogos (*Cta1* y *Ctt1*), para llevar a cabo los análisis de identidad y filogenias moleculares.

Para los análisis se utilizó BLASTP, ClustalW 1.83, ClustalX 0.1, Phylip 3.6 y Seqboot (con 1,000 repeticiones en los análisis de ortólogos y 100 en los de parálogos).

Los análisis de parsimonia se hicieron utilizando Protpars y Consense y los de máxima verosimilitud con Protdist, Neighbor y Consense. La observación se hizo utilizando TreeView X.

V. RESULTADOS

V.1 *Debaryomyces hansenii* es una levadura eurihalina

La cepa Y7426 de *Debaryomyces hansenii* fue mantenida en cajas de YP - NaCl con 0.6 M de cloruro de sodio. Se estudió el tiempo de duplicación de esta levadura mediante una curva de crecimiento de la cepa cultivada sin sal y con concentraciones crecientes de NaCl. Los reportes indicaban que es capaz de tolerar hasta 24% de sal en el medio de cultivo, lo que equivale a 4.1 M de NaCl (Norkrans 1966). En la figura 7, se muestra la curva de crecimiento de *D. hansenii* cultivada en YPD y condiciones crecientes de NaCl y en la tabla 1 los tiempos de duplicación correspondientes a esta curva de crecimiento.

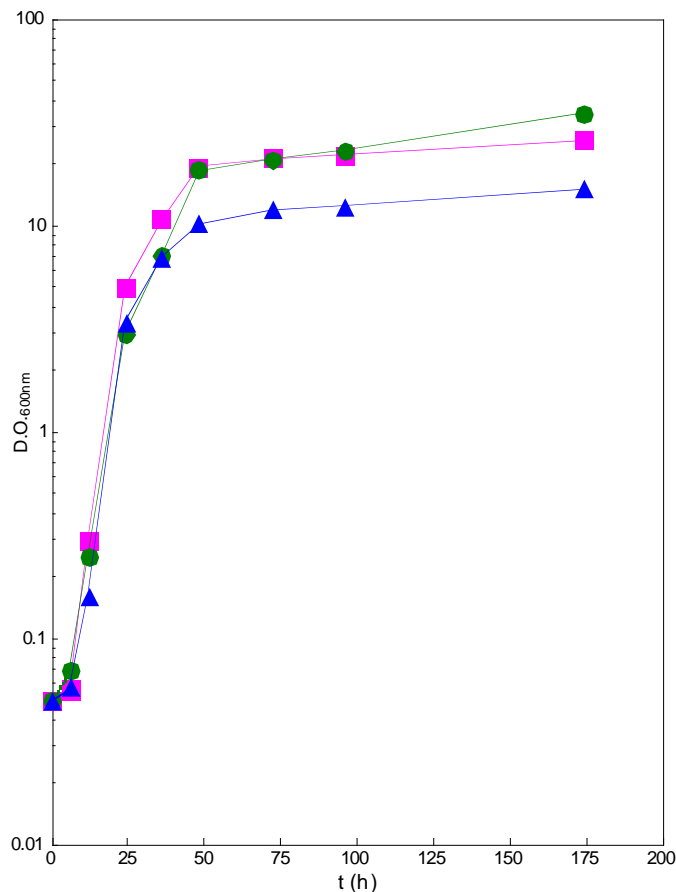


Figura 7. Curva de crecimiento de *Debaryomyces hansenii* en YPD y distintas concentraciones de NaCl. Se siguió la proliferación de *D. hansenii* por 180 horas en medio rico y 0 (□), 0.6 (●) y 1.5 M (▲) de NaCl por el incremento en la DO_{600nm}.

Esta levadura es considerada halófila y halotolerante, sin embargo la diferencia entre ambos términos no es clara. Algunos autores (Ramos 2005) la definen como amante de la sal, otros como halófila (González-Hernández y cols. 2004). Este último término se utiliza para aquellos organismos que viven y se reproducen mejor en medios hipersalinos que en medios carentes de sal (González-Hernández y Peña 2002). Algunos autores, aquellos que reconocen que *D. hansenii* no requiere de la sal para proliferar (Gori y cols. 2007), la consideran halotolerante, en virtud de que la sal la hace resistir a ciertas condiciones de estrés. Halotolerante se utiliza para organismos que pueden crecer en altas concentraciones de sal –lo cual no quiere decir que lo prefieran-, o sin ella. De acuerdo a una revisión reciente (Gunde-Cimerman y cols. 2009), los hongos capaces de crecer *in vitro* a concentraciones de hasta 3.0 M y que han sido aislados de medioambientes en los que la salinidad es mayor a 1.7 M, son halofílicos, mientras que aquellos en los que ciertos aislados esporádicos pueden crecer *in vitro* en 3.0 M de sal son considerados halotolerantes. Hay grupos de investigadores que han reportado un mayor crecimiento de *D. hansenii* cuando es crecida en presencia de NaCl ó KCl, mostrando además que en presencia de sales se incrementa la producción de etanol y se eleva la capacidad respiratoria (Sánchez y cols. 2008).

Tabla 1. Tiempo de duplicación y velocidad de crecimiento de <i>D. hansenii</i> en medio rico y diferentes concentraciones de NaCl		
Medio de cultivo	Tiempo de duplicación (min)	Velocidad de crecimiento (h⁻¹)
YPD	270	0.231 h ⁻¹
YPD – 0.6 M NaCl	270	0.231 h ⁻¹
YPD – 1.5 M NaCl	270	0.231 h ⁻¹

En este trabajo, se ha preferido utilizar el término eurihalino (del griego *euros*, amplio y *halino*, sal), como lo han usado antes otros autores (Thome y Trench 1999), debido a que, en cuanto a crecimiento, el comportamiento de esta levadura es exactamente igual con 1.5 M de NaCl que sin este compuesto (figura 7, tabla 1) y con concentraciones mayores se incrementa el tiempo de duplicación, pero la levadura permanece viable.

Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*

En todo caso, en la figura 8 se muestra el crecimiento en cultivo sólido de *Debaryomyces hansenii* y otra levadura, esta sensible al NaCl, *Saccharomyces cerevisiae*. Como se puede apreciar, *S. cerevisiae* logra crecer en una placa con medio YPD y 1.5 M de sal, pero en la otra placa, con 1.6 M de NaCl, ya no logra proliferar. En cambio *D. hansenii* crece sin dificultad alguna.

Por otro lado, se ha reportado que *D. hansenii* es un contaminante común no sólo de carnes frías, quesos y salmueras (alimentos salados), sino también de helados, yogures y mermeladas (Ismail y cols. 2000), en los que el estrés iónico ya no jugaría un papel destacado y predominaría el efecto osmótico, reforzando el carácter eurihalino de este microorganismo.

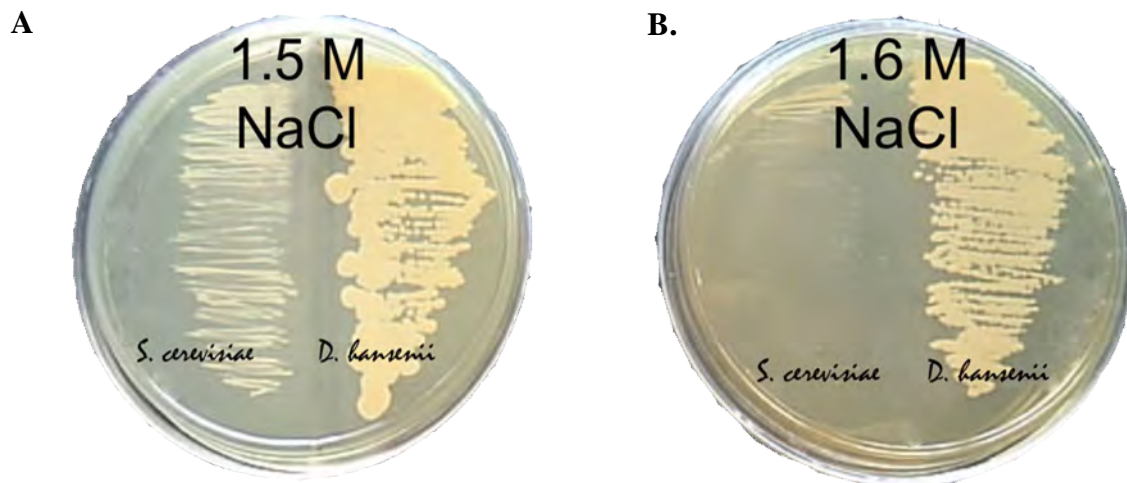


Figura 8. Crecimiento de *S. cerevisiae* (izq) y *D. hansenii* (der) en medio rico sólido YPD con A. 1.5 y B. 1.6 M de NaCl.

El MM Difco, compuesto por sales, vitaminas, elementos traza, 2% de glucosa como fuente de carbono y NH_2SO_4 2.5 M como fuente de nitrógeno, no permite sostener el crecimiento de *D. hansenii*. Norkrans (1966) había reportado un medio mínimo para esta levadura que contiene sales adicionales a las de Difco. En nuestro laboratorio se adoptó este medio SN Asn (SN, sin nitrógeno, con asparagina 7.5 mM como única fuente de nitrógeno). En la figura 9, se muestra la curva de crecimiento en SN Asn, SN Asn – NaCl 1M, MM y MM – NaCl 1.0 M.

Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*

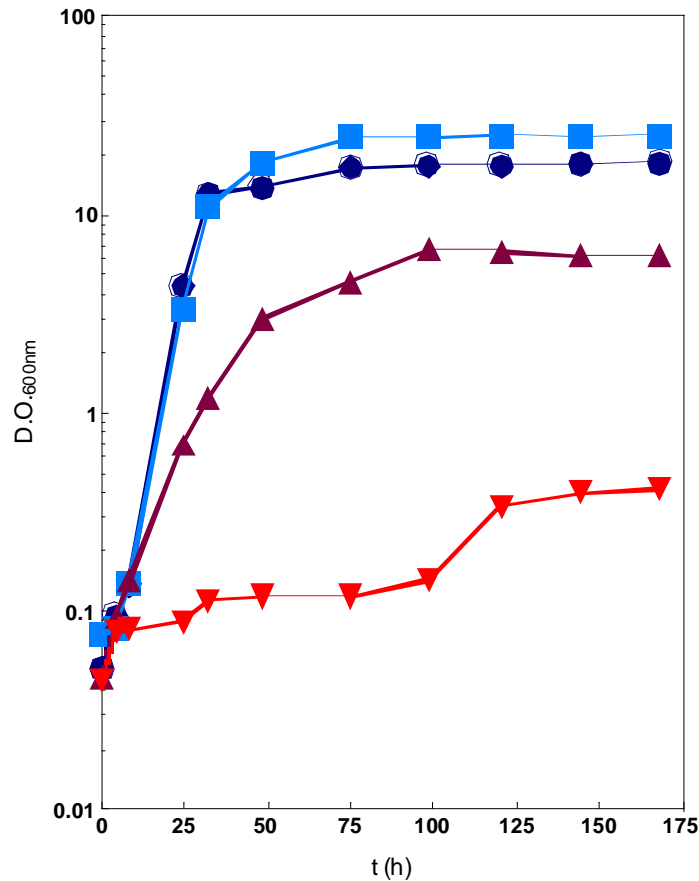


Figura 9. Comparación de la curva de crecimiento de *Debaryomyces hansenii* en medio mínimo SN Asn y medio mínimo Difco con y sin NaCl 1M, seguida durante 172 horas. ● SN Asn; ■ SN Asn - NaCl 1 M; ▲ MM-Difco; ▼ MM-Difco - NaCl 1M. SN: Sin Nitrógeno. Asn: Asparagina 7.5 mM utilizada como única fuente de nitrógeno.

Tabla 2. Tiempo de duplicación y velocidad de crecimiento de *D. hansenii* en medio mínimo SN Asn y diferentes concentraciones de NaCl

Medio	Tiempo de duplicación (min)	Velocidad de crecimiento (h^{-1})
SN Asn	270	0.154
SN Asn - 0.5 M NaCl	270	0.154
SN Asn - 1.0 M NaCl	270	0.154
SN Asn - 1.25 M NaCl	330	0.138
SN Asn - 1.5 M NaCl	330	0.138
SN Asn - 1.75 M NaCl	480	0.126
SN Asn - 2.0 M NaCl	1020	0.087
SN Asn - 2.25 M NaCl	1680	0.041

En la figura 10 se muestran las curvas de crecimiento correspondientes al cultivo de *D. hansenii* en medio SN Asn y distintas concentraciones de NaCl. Es de notarse que el tiempo de duplicación, que se muestra en la tabla 2, es el mismo desde el medio sin sal y con hasta 1.0 M de este compuesto.

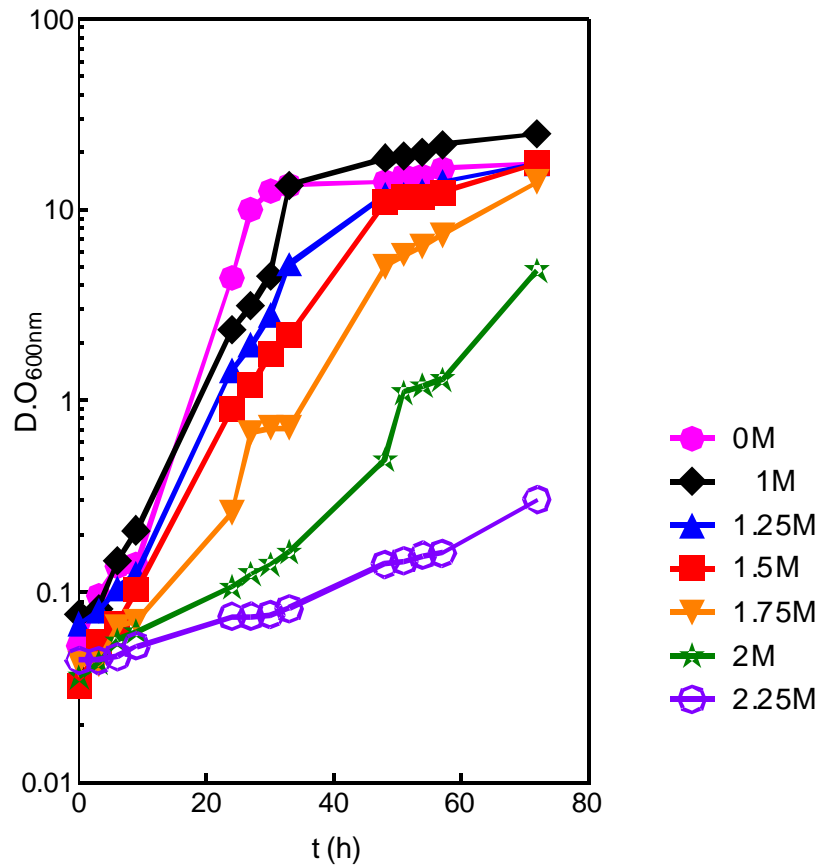


Figura 10. Curva de crecimiento de *Debaryomyces hansenii* en medio mínimo SN Asn y diferentes concentraciones de NaCl, seguida durante 72 horas. ● sin sal; ◆ 1.0 M NaCl; ▲ 1.25 M NaCl; ■ 1.5 M NaCl; ▼ 1.75 M NaCl; ★ 2.0 M NaCl; ○ 2.25M

V.2 *Debaryomyces hansenii* es capaz de crecer en fuentes de carbono no fermentables

Se exploró la utilización de fuentes de carbono no fermentables, ya que no existían reportes a ese respecto. Para eso, se hicieron curvas de crecimiento de *D. hansenii* cultivada en YP – EtOH, YP – MetOH y YP – GlicOH, en presencia de diferentes concentraciones de NaCl. Como se aprecia en la figura 11, *D. hansenii* es capaz de utilizar estos alcoholes como fuente de carbono, y lo hace con el mismo tiempo de duplicación en presencia o ausencia de NaCl (tabla 3).

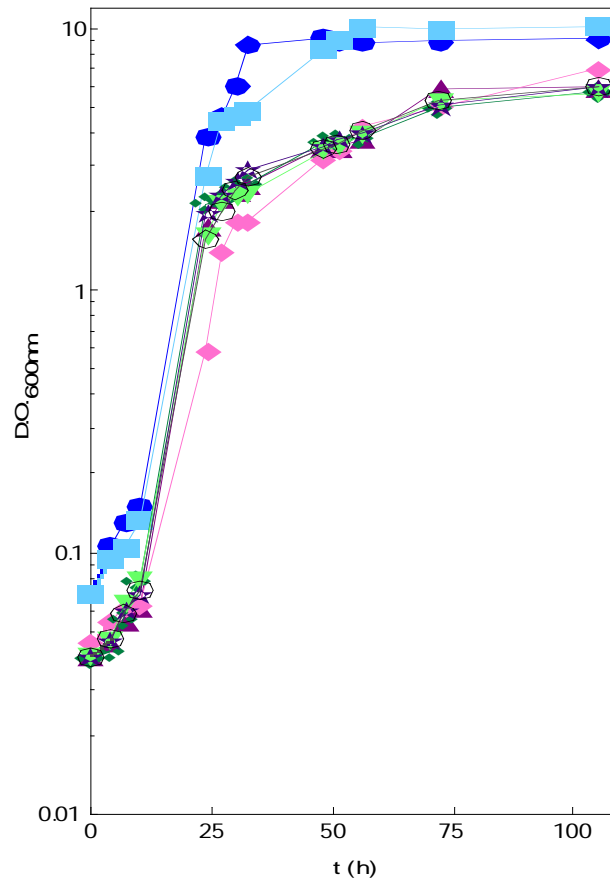


Figura 11. Curva de crecimiento de *Debaryomyces hansenii* en medio rico YP con diferentes fuentes de carbono, seguida por 105 horas. ● YPD (glucosa); ■ YPD - NaCl 1.0 M; ▲ YPE (etanol); ◆ YAG - NaCl 1.0 M; ▼ YPMetOH (metanol); ▽ YPMetOH - NaCl 1.0 M; ★ YPGlic (glicerol); ○ YPGlic - NaCl 1.0 M.

Con el fin de verificar que el crecimiento en alcoholes no se debiera a esqueletos carbonados presentes en el medio YP y que sí fuera realmente la utilización de los alcoholes como única fuente de carbono lo que promovía el crecimiento, se hizo un control en el experimento anterior, cultivando a *D. hansenii* únicamente en YP, cultivo que no mostró crecimiento alguno. De todas maneras, se cultivó a la levadura en SN Asn - alcoholes como fuentes únicas de carbono y en la figura 12 se muestra que este microorganismo es capaz de utilizar al alcohol aún en la ausencia de cualquier esqueleto carbonado, situación que ocurre en el medio SN Asn.

Tabla 3. Tiempo de duplicación y velocidad de crecimiento de *D. hansenii* en medio mínimo rico YP y diferentes fuentes de carbono, en presencia y ausencia de NaCl

Medio	Tiempo de duplicación (min)	Velocidad de crecimiento (h ⁻¹)
YPD	270	0.154
YPD + NaCl 1.0 M	270	0.154
YPEtOH	270	0.154
YPEtOH + NaCl 1.0 M	300	0.142
YPMetOH	270	0.154
YPMetOH + NaCl 1.0 M	270	0.154
YPGlicerol	270	0.154
YPGlicerol + NaCl 1.0 M	270	0.154

Ahora bien, tal como se analiza en la introducción, había ya varios reportes en los que se proponía que la presencia de sal en el medio de cultivo mejoraba la capacidad de *D. hansenii* para contender con estreses distintos del salino, como con calor, con la presencia de metales pesados, etc.; asimismo, ya se sabía que la velocidad respiratoria se incrementaba en presencia de sal y que además la actividad de algunas enzimas aumentaba; en nuestro grupo (Alba-Lois y cols. 2004) habíamos demostrado que la glutamato deshidrogenasa (*DhNADP-GDH*), enzima encargada de convertir al 2-oxoglutarato en ácido glutámico mediante la incorporación de una molécula de amonio, mostraba un incremento de entre 4 y 6 veces la actividad determinada *in vitro*, cuando la levadura había sido cultivada en presencia de 1.0 M de NaCl con respecto a sin sal.

Demostramos mediante Northern blot (no publicado) que el incremento en la actividad se debía a un aumento en los niveles de transcripción de este gen, esto es, la sal provocó el incremento en la síntesis del mRNA que codifica a la GDH. Sin embargo, determinamos que la concentración de glutamato no se incrementó como consecuencia de esta mayor cantidad de enzima. La actividad de la enzima purificada sí se inhibió por la fuerza iónica, sugiriendo que el incremento en la síntesis es para compensar la inactivación de la *DhNADP-GDH* provocada por la fuerza iónica, en concordancia con lo reportado por Prista y cols (Prista y cols. 2005), quienes demostraron que *D. hansenii* puede acumular hasta 600 mM de Na⁺ intracelularmente cuando es cultivada en presencia de 1.0 M de NaCl.

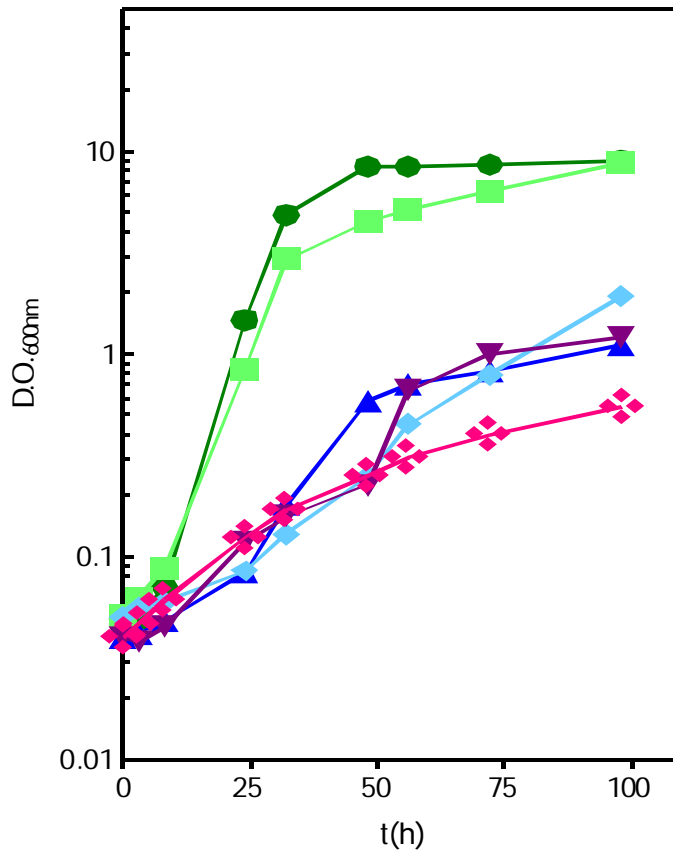


Figura 12. Curva de crecimiento de *Debaryomyces hansenii* en medio SN Asn con diferentes fuentes de carbono y NaCl 1.0 M, seguida durante 100 horas. ● SN Asn - glucosa; ■ SN Asn - glucosa - NaCl; ▲ SN Asn - etanol; ◆ SN Asn - etanol - NaCl; ▼ SN Asn - metanol; ◆ SN Asn - MetOH - NaCl.

V.3 La actividad de catalasa determinada *in vitro* de *Debaryomyces hansenii* es más alta que la de *S. cerevisiae* en las mismas condiciones

Hernández – Saavedra y Ochoa (Hernández-Saavedra y Ochoa 1999), habían reportado que la actividad de la enzima superóxido dismutasa Cu-Zn-SOD de *Debaryomyces hansenii* cultivada en un medio de crecimiento que contiene agua de mar era la más alta reportada hasta entonces en un extracto crudo.

Esta enzima descompone al radical superóxido, convirtiéndolo en peróxido, de manera que destruye a un radical muy reactivo generando uno menos reactivo. Aún así, el H₂O₂ también es parcialmente tóxico debido a que puede formar oxígeno singulete y radical

hidroxilo. Paradójicamente, el H₂O₂ se requiere también para llevar a cabo funciones celulares esenciales relacionadas con la transducción de señales, como crecimiento y proliferación celular, diferenciación y apoptosis en organismos superiores (Veal y cols. 2007, Domínguez y cols. 2010). Los seres vivos utilizan a la catalasa para descomponer al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, como parte del sistema enzimático de defensa contra el estrés oxidativo. En la introducción expliqué que *S. cerevisiae* tiene dos enzimas con actividad de catalasa, una peroxisómica, que serviría para contender con el H₂O₂ generado durante la β-oxidación de los ácidos grasos, y la otra, citoplasmática, para contender con las situaciones de estrés oxidativo (Ruis y Köller 1997). Además, esta última actividad de catalasa se incrementa ante otras condiciones de estrés, como calórico, osmótico, deprivación de nutrientes o por presencia de sal (Krawiec y cols. 2000, Teixeira y cols. 2004, Braga y cols. 2005), lo que nos llevó a considerar que en *Debaryomyces hansenii* un incremento en la producción de H₂O₂ debido tanto a una alta actividad de SOD como a la presencia de altas concentraciones de Na⁺, pudiera ejercer un efecto positivo sobre la actividad de catalasa o sobre la expresión de los genes que las codifican. En nuestro laboratorio nos propusimos determinar la actividad de catalasa en extractos crudos de *Debaryomyces hansenii* y de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas en medio rico YPD en presencia o no de 0.6 M de NaCl. Como se observa en la tabla 4, los resultados mostraron que extractos de *S. cerevisiae* cultivada en presencia de sal tuvieron un incremento de 5 veces en la actividad específica de catalasa con respecto a los de la misma levadura crecidos sin NaCl (0.03 ± 0.009 versus 0.152 ± 0.021 mmoles de H₂O_{2oxidado}/min/mg de proteína).

Tabla 4. Actividad específica * de catalasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Debaryomyces hansenii</i> en medio rico YPD con y sin 0.6 M de NaCl		
Medio	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
YPD	0.03 ± 0.009	0.73 ± 0.16
YPD – NaCl 0.6 M	0.152 ± 0.021	1.5 ± 0.23

* mmoles de H₂O_{2oxidado}/min/mg de proteína

Sin embargo, en el caso de la levadura *D. hansenii*, la actividad en los extractos cuando fue crecida con sal apenas mostraron el doble de la actividad que los sin sal (0.73 ± 0.16 versus 1.5 ± 0.23 mmoles de H₂O_{2oxidado}/min/mg de proteína, tabla 4). Asimismo, en la

tabla se puede comparar la actividad de catalasa de cultivos crecidos en medio rico de ambas levaduras, siendo claro que los extractos de *D. hansenii* tienen 24 veces mayor actividad con respecto a los de *S. cerevisiae* (0.03 ± 0.009 vs. 0.73 ± 0.16 mmoles de $\text{H}_2\text{O}_{2\text{oxidado}}$ /min/mg de proteína); de la misma manera, los extractos obtenidos de *D. hansenii* crecida en medio YPD–NaCl mostraron 8 veces más actividad que los de *S. cerevisiae* provenientes del mismo medio (0.152 ± 0.021 vs. 1.24 ± 0.02 mmoles de $\text{H}_2\text{O}_{2\text{oxidado}}$ /min/mg de proteína). Así, se podría considerar que la actividad basal de catalasa, que es más alta en la levadura eurihalina, resultaría en una mayor tolerancia intrínseca de esta levadura a un estrés oxidativo, comparada con la levadura de pan. De esta manera, decidimos analizar la respuesta de ambas levaduras a un choque oxidativo utilizando peróxido de hidrógeno. Las dos especies fueron cultivadas hasta fase exponencial ó fase estacionaria, siendo tratadas entonces con concentraciones crecientes de H_2O_2 . Los resultados se muestran en la figura 13. Como se puede apreciar, el ensayo de viabilidad celular reveló que durante la fase de crecimiento exponencial, *Debaryomyces hansenii* es capaz de tolerar una concentración de peróxido que inhibe el crecimiento de *S. cerevisiae* y que si las levaduras fueron cultivadas en presencia de NaCl 0.6 M, el fenotipo de resistencia de la levadura eurihalina es aún más evidente, ya que el crecimiento de *S. cerevisiae* se ve severamente comprometido por la presencia de las dos condiciones de estrés (sal y peróxido). Como era de esperarse, en fase estacionaria, ambas levaduras toleran mayor cantidad de H_2O_2 lo mismo si provienen de cultivos con sal que sin ella. Esto indicaba que la mayor actividad de catalasa que posee *D. hansenii* (con respecto a *S. cerevisiae*) tanto en YPD como en YPD–NaCl 0.6 M la capacita para tener una mayor tolerancia al peróxido de hidrógeno.

Con el fin de profundizar en el papel que pudiera jugar la catalasa en la tolerancia al estrés oxidativo, se llevó a cabo una comparación de las secuencias genómicas entre ambas levaduras, para identificar el o los posibles genes ortólogos a los de catalasas de *S. cerevisiae*.

V.4 Análisis filogenético de levaduras utilizando la secuencia de catalasa

Tal como se explicó en la introducción, el gen que codifica a la catalasa citoplasmática de *Saccharomyces cerevisiae* es *CTT1* (YGR088W) y el de la peroxisómica *CTA1* (YDR256C). En el genoma de *D. hansenii* (disponible en <http://www.genolevures.org>) se encontraron dos ORFs que posiblemente codificarían para las dos isoformas de catalasa, con un peso molecular aproximado de 54.9 y 63.1 kDa, respectivamente. El ortólogo del gen *CTA1*, *DhCTA1* se identificó como el ORF DEHA2F10582g, en el cromosoma F, mientras que *DhCTT1* se encontró en el cromosoma B, identificado como el ORF DEHA2B16214g.

Se han reportado organismos con múltiples genes de catalasa, como *Aspergillus nidulans*, que tiene al menos cuatro, que se expresan de manera diferencial en las distintas etapas del desarrollo (Kawasaki y Aguirre 2001; Kawasaki y cols. 1997). Otros hongos, como *Candida albicans*, tienen sólo un gen que codifica para catalasa, y su expresión parece ser importante en la patogenicidad de este organismo (Wysong y cols. 1998).

Se ha sugerido que la catalasa A, que es peroxisómica, funcionaría para contender con las especies reactivas de oxígeno generadas durante la β -oxidación de los ácidos grasos, ya que *S. cerevisiae* no lleva a cabo β -oxidación mitocondrial y la acetil-CoA, el NADH y el NADPH se producen en los peroxisomas (Feron y cols. 2005). En cambio, la catalasa T, cuya localización es citosólica, es una proteína cuya expresión se induce como respuesta a diferentes tipos de estrés.

Saccharomyces cerevisiae

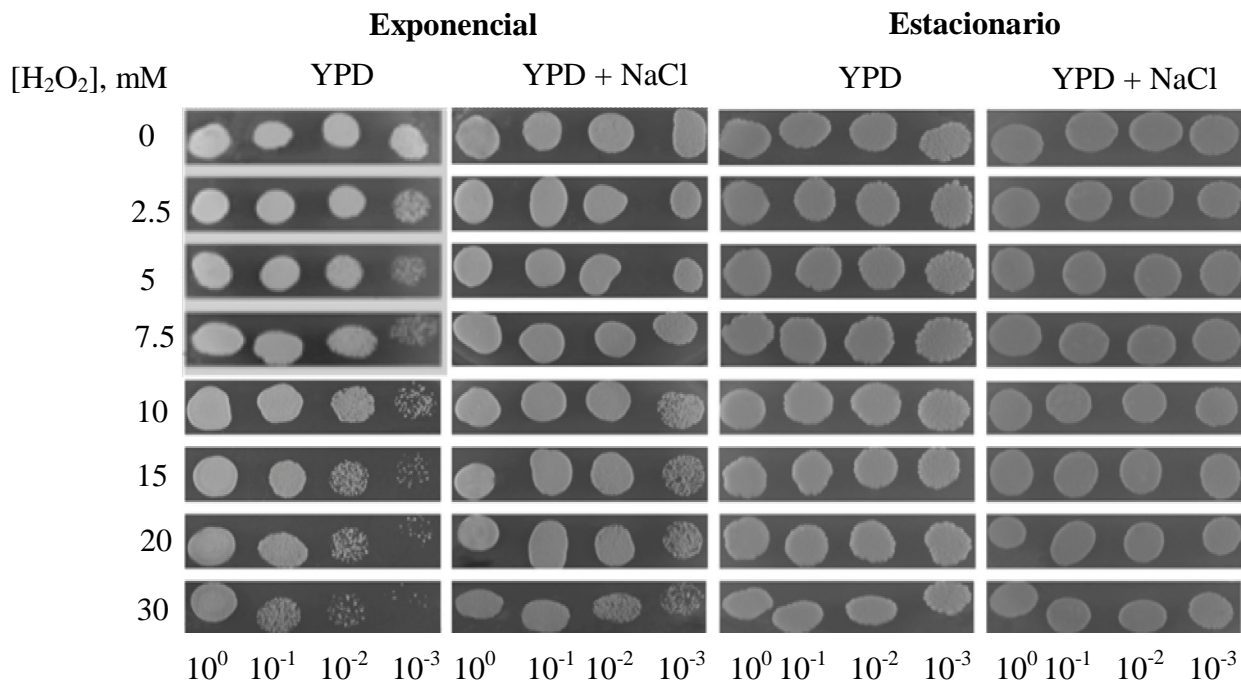
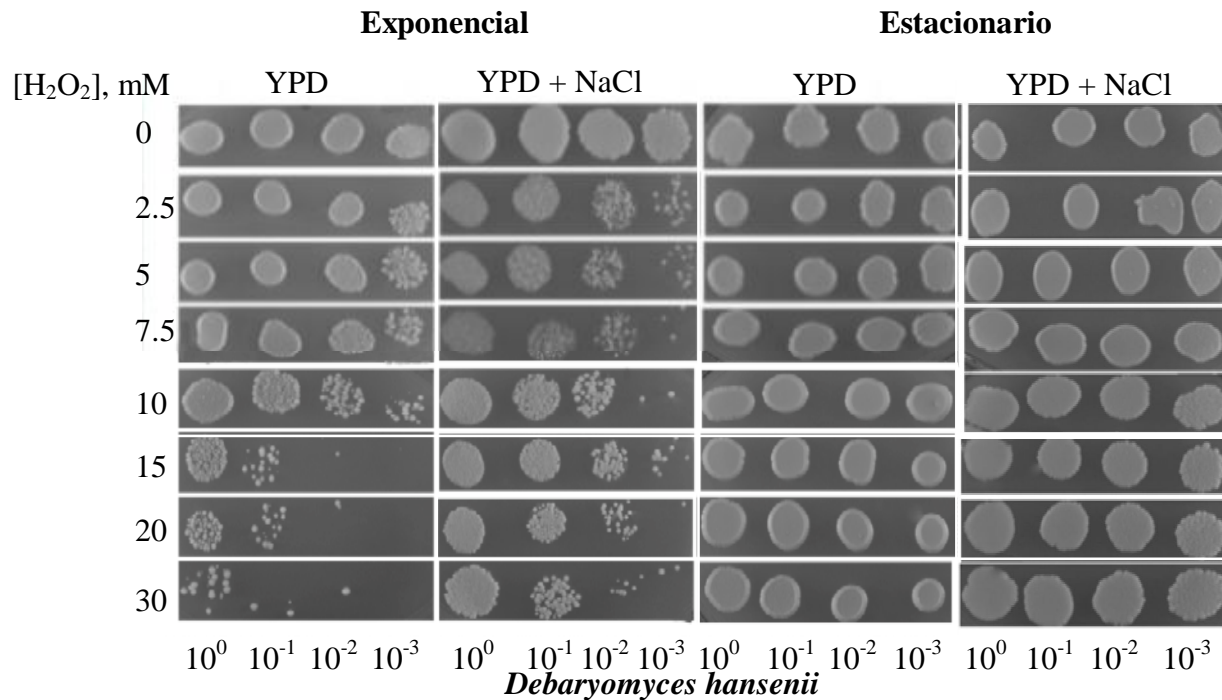


Figura 13. Ensayo de viabilidad celular de *S. cerevisiae* y *D. hansenii* tras un choque de 3 h con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno, células cultivadas en medio rico YPD con y sin NaCl 0.6 M. Arriba se muestra el resultado con *S. cerevisiae* y abajo con *D. hansenii*. Las células fueron cultivadas hasta fase de crecimiento exponencial o estacionario y el tratamiento fue dado con la concentración de peróxido que se muestra a la izquierda. Para cada concentración de H₂O₂ se sembraron diluciones desde 10⁰ hasta 10⁻³, que se señalan abajo.

Sin embargo, no todas las levaduras poseen dos genes que codifiquen catalasas. Por eso, se hizo una búsqueda sistemática de las secuencias reportadas de catalasas de levaduras y se determinó de qué catalasa se trataba. Con las secuencias se hizo un análisis filogenético y se compararon los árboles obtenidos con las filogenias reportadas con secuencias de rDNA de hemiascomicetos.

Se obtuvo en la base de datos del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* (SDB) la secuencia de aminoácidos de *ScCTAI*, de 515 residuos, y la secuencia de *ScCTT1*, de 562 residuos. En la tabla 5 se muestran los ortólogos de *ScCTAI* y su porcentaje de identidad (con respecto a *ScCTAI*) y en la tabla 6 los ortólogos de *ScCTT1* y su porcentaje de identidad. Se tomaron 19 especies de hemiascomicetos que presentaron ortólogos de *ScCTAI* y se buscó de manera exhaustiva en esos mismos microorganismos la presencia de *ScCtI1p* reportada.

Tabla 5. Ortólogos a <i>CTAI</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con su porcentaje de identidad		
Especie de ascomiceto	Residuos de aminoácidos	% de identidad
<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	513	98
<i>Saccharomyces mikatae</i>	513	98
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	513	98
<i>Saccharomyces bayanus</i>	512	93
<i>Kluyveromyces lactis</i>	491	90
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	511	90
<i>Candida glabrata</i>	499	89
<i>Ashbia gossypium</i>	507	88
<i>Saccharomyces servazzii</i>	353	88
<i>Saccharomyces castelli</i>	506	88
<i>Debaryomyces hansenii</i>	485	79
<i>Candida albicans</i>	485	79
<i>Candida dubliniensis</i>	485	79
<i>Candida tropicalis</i>	485	78
<i>Yarrowia lipolytica</i>	492	75
<i>Pichia angusta</i>	507	70
<i>Candida boidinii</i>	504	68
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	532	68
<i>Neurospora crassa</i>	736	57
<i>Homo sapiens</i>	527	63

Sin embargo, sólo se lograron identificar secuencias ortólogas a *ScCttIp* en 8 de las 19 levaduras. Aquí es necesario hacer notar que no se encontró ningún caso en el que hubiera un ortólogo de *ScCttIp* sin la presencia de un ortólogo de *ScCtaIp*, lo que podría sugerir que la catalasa peroxisómica es común a todos los hemiascomicetos y que la catalasa citosólica fue resultado de una duplicación y divergencia posterior.

Tabla 6. Ortólogos a <i>CTT1</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con su porcentaje de identidad		
Especie de ascomiceto	Residuos de aminoácidos	% de identidad
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	562	99
<i>Saccharomyces mikatae</i>	562	97
<i>Saccharomyces bayanus</i>	562	96
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	554	82
<i>Saccharomyces castelli</i>	560	82
<i>Kluyveromyces lactis</i>	550	78
<i>Yarrowia lipolytica</i>	532	68
<i>Debaryomyces hansenii</i>	557	67

Con el fin de analizar si realmente la secuencia que codifica a la catalasa T fue originada a partir de una duplicación de *CTA1*, se llevó a cabo el análisis de identidad entre estas dos secuencias de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 14, a nivel de aminoácidos y figura 15, a nivel de nucleótidos).

Como se puede apreciar, tanto a nivel de aminoácidos como de nucleótidos, la identidad es muy alta. Estas dos secuencias son seguramente homólogas. Al llevar a cabo una búsqueda intragenómica, con cualquiera de las dos secuencias de proteína, sólo se encuentra la otra, de manera que parece no haber otras secuencias homólogas en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*.

En estas dos figuras, se observa claramente que ambas secuencias tienen un origen común, por ello se propone que *CTT1* se originó como resultado de una duplicación y posterior divergencia de *CTA1*. Cabe aclarar que la duplicación de estas secuencias ocurrió en una etapa anterior a la de la duplicación masiva del genoma de *Saccharomyces*, esto es, son parálogas y no onhólogas (Turunen y cols. 2009).

Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*

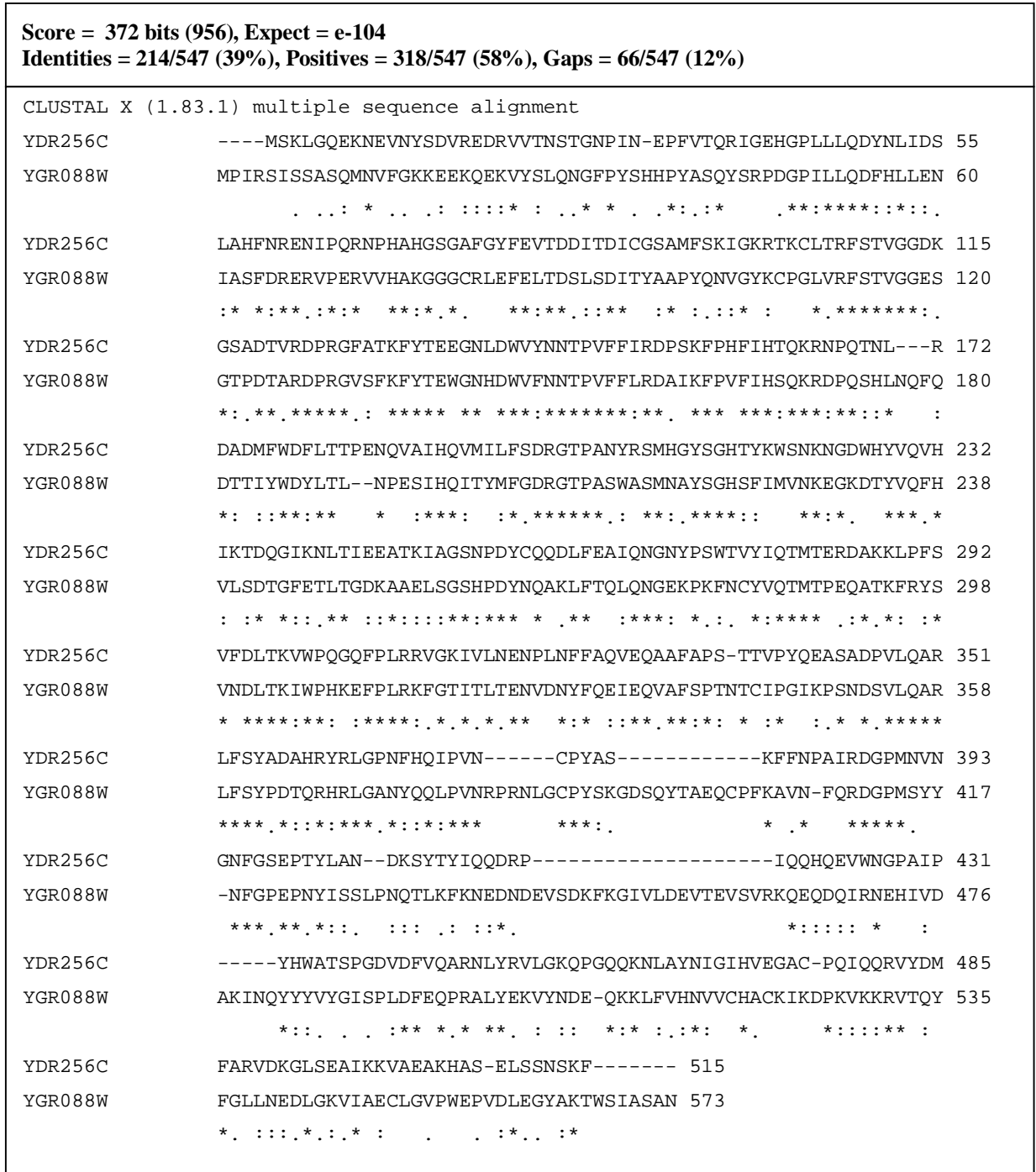


Figura 14. Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de *Ctal* (YDR256C) y *Ctt1* (YGR088W) de *Saccharomyces cerevisiae*. * muestra la posición de aminoácidos idénticos; : muestra un cambio conservado; · muestra un cambio menos conservado.

En la figura 16 se muestran los árboles obtenidos mediante los métodos de parsimonia (panel A) y máxima verosimilitud (panel B) para la secuencia de la catalasa A.

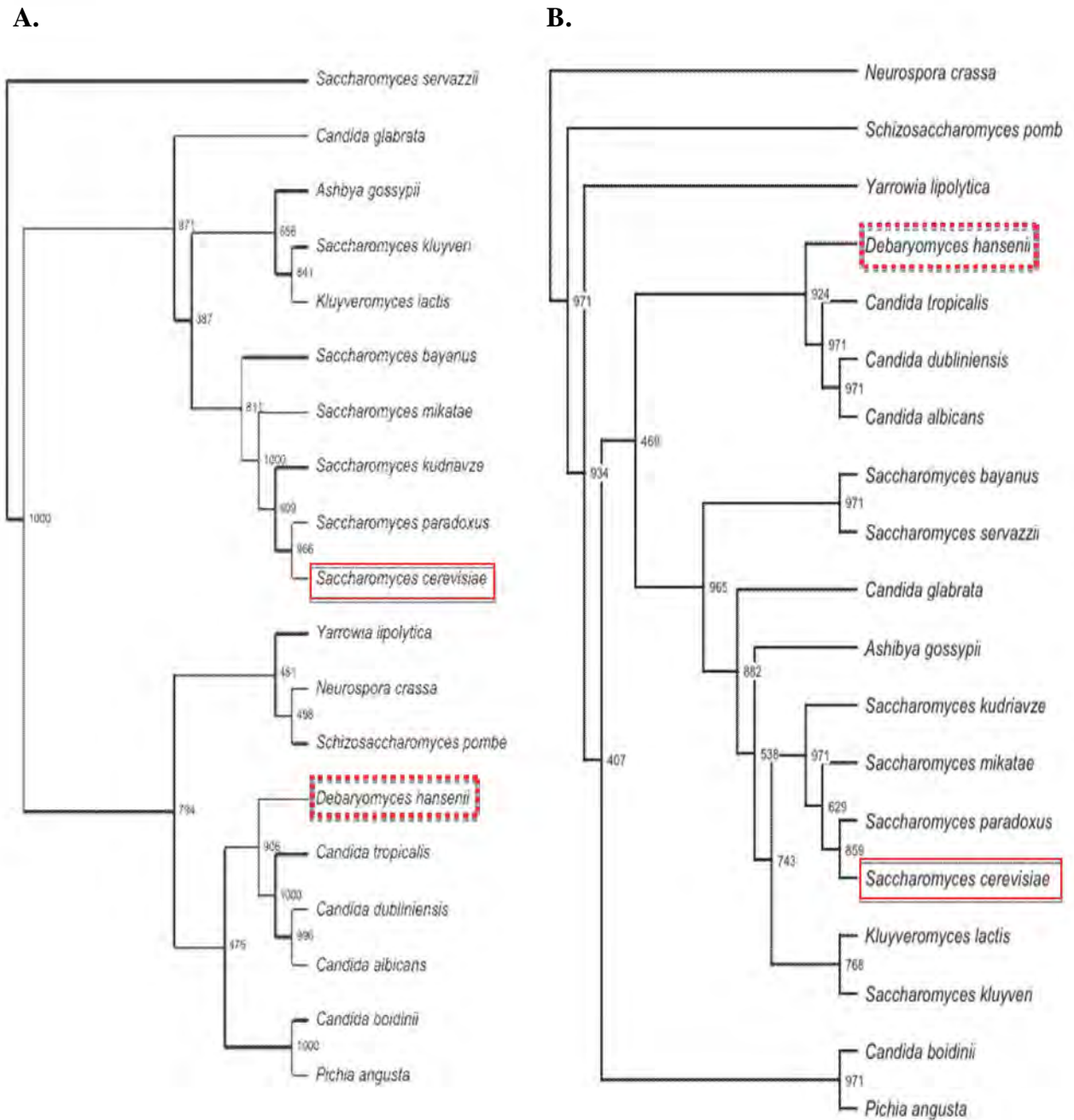


Figura 16. Árboles filogenéticos obtenidos mediante métodos de parsimonia (panel A), y máxima verosimilitud (panel B) a partir de la secuencia de la catalasa A. *Saccharomyces cerevisiae*; *Debaryomyces hansenii*. Los números en los nodos representan el valor de bootstrap.

Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*

En la figura 17 se muestran los árboles obtenidos mediante los métodos de parsimonia (panel A) y máxima verosimilitud (panel B) para la catalasa T.

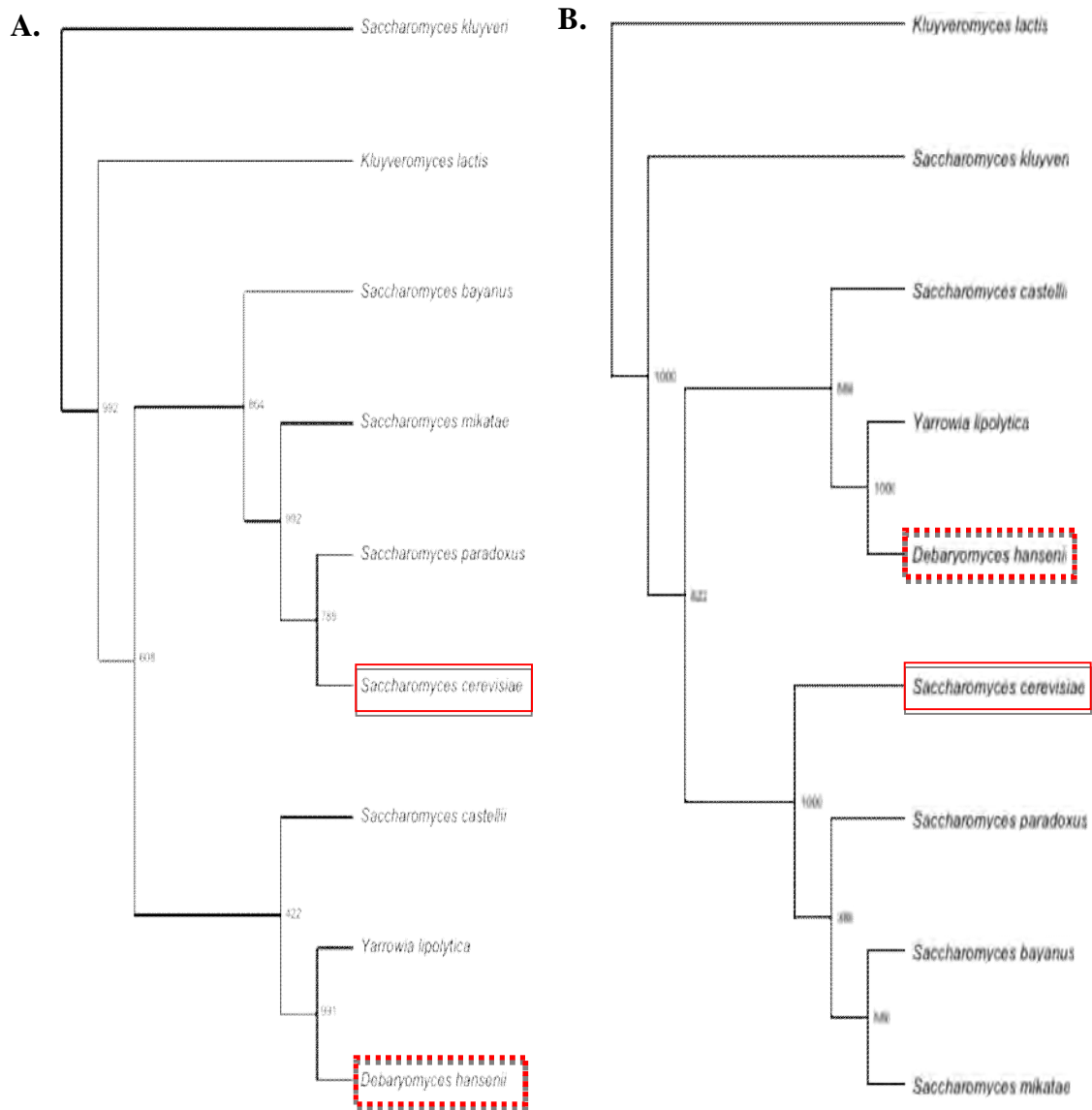


Figura 17. Árboles filogenéticos obtenido mediante métodos de parsimonia (panel A) y máxima verosimilitud (panel B). Saccharomyces cerevisiae; Debaryomyces hansenii. Los números en los nodos representan el valor de bootstrap.

Basándose en la genómica comparativa entre 5 especies de hemiascomicetos, el grupo de *Genolevures* propusieron los siguientes eventos en la evolución de los hemiascomicetos (figura 18):

Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*

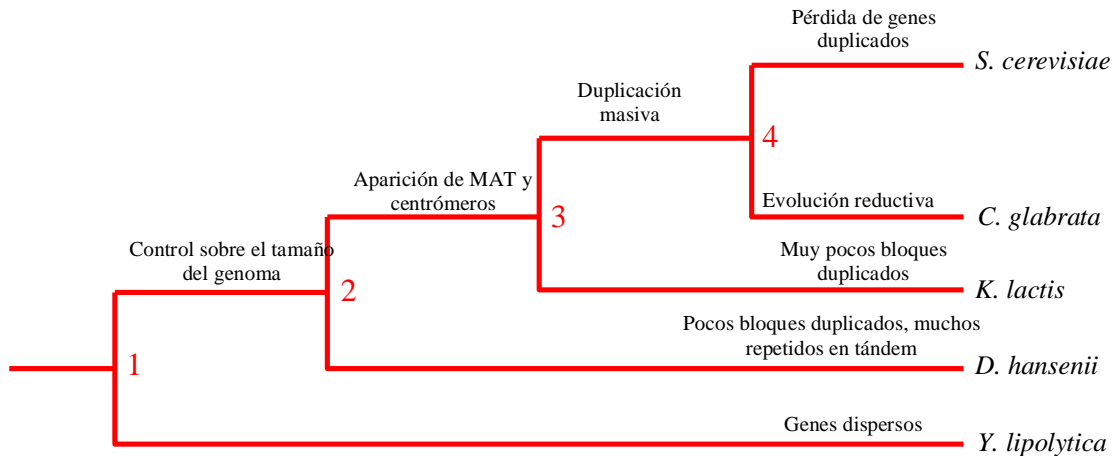


Figura 18. Principales eventos en la evolución de los hemiascomicetos. La topología de este árbol se basó en las secuencias de 25S rDNA de las levaduras descritas. Tomado de Sherman y cols. 2006.

En el momento en que *Yarrowia lipolytica* se separó de *Debaryomyces hansenii*, *Kluveromyces lactis*, *Candida glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae* (nodo 1), una de las ramas resultantes sufrió fuertes restricciones sobre el tamaño del genoma, perdiendo transposones aunque manteniendo los retrotransposones, mientras que la rama de *Y. lipolytica* conservó un genoma de 20.5 Mb; las otras cuatro tienen genomas de alrededor de 12 Mb, debido a la pérdida simultánea de intrones. De manera que estos autores proponen que la duplicación coordinada de genes, sea a través de segmentos cromosómicos o mediante repeticiones de genes en tándem, se convirtió en la ruta para crear las copias de parálogos en la que se basa la subsecuente diversificación. En la siguiente separación (nodo 2), una de las ramas, en la que se separó *Debaryomyces hansenii*, mantuvo un bajo nivel de duplicación de segmentos, mostrando más bien una formación masiva de repeticiones en tándem, mientras que en la otra rama la región centromérica se redujo a un segmento muy bien definido (de 125 pb en *Saccharomyces* spp) lo que provee de una mejor segregación cromosómica a esas levaduras (Clarke 1990, Lynch y cols. 2010). En el tercer nodo, excepto *K. lactis*, las otras sufrieron de una duplicación masiva del genoma, compensada después por la pérdida masiva de muchos de los pares parálogos así creados (nodo 4). Esta pérdida de parálogos ha dejado reliquias detectables en *S. cerevisiae*. En *C. glabrata*, la pérdida de parálogos fue tan extensa que dio como resultado una evolución reductiva, con pérdida de funciones y un grado de redundancia genómica similar al de *K. lactis* (mucho menor que el de *D. hansenii* y *Y. lipolytica*).

Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*

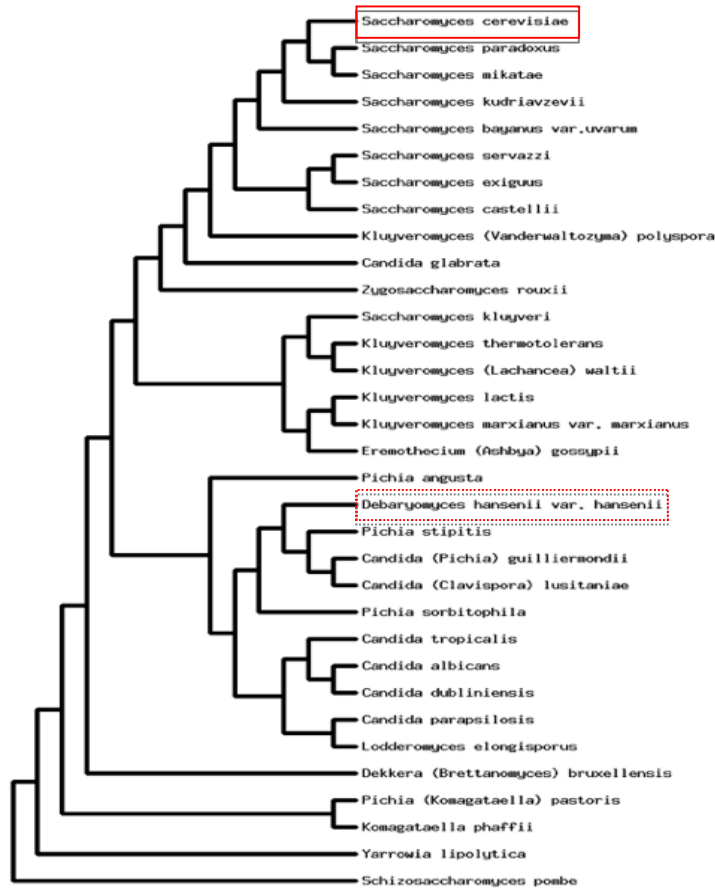


Figura 19. Cladograma construido usando máxima verosimilitud con 153 genes universales del reino Fungi (tomado de <http://www.genolevures.org/yeastgenomes.html#>). *Saccharomyces cerevisiae*; *Debaryomyces hansenii*.

Los árboles generados en este trabajo, de alguna manera coinciden, al menos en orden de divergencia, con lo propuesto por estos autores. Aún más, estos mismos autores proponen un árbol filogenético (figura 19) de 33 especies de levaduras hemiascomicetas derivado del análisis de 153 secuencias del reino Fungi y obtenido por métodos de máxima verosimilitud, cuyo resultado es bastante similar al que se obtuvo en este trabajo mediante la construcción del árbol de *CTAI*, lo que, aunque aquí se haya utilizado sólo la secuencia de una proteína sujeta a una presión de selección particular distinta a la de los genomas completos, robustece la hipótesis de la evolución de los hemiascomicetos, que es una estrategia que sigue siendo ampliamente utilizada (Ossowski y cols. 1993, Lin y Li 2011). Finalmente, la secuencia de aminoácidos de una proteína determina su estructura, que a su vez determina la función. Pero es la función el blanco de la selección natural, no la secuencia ni la estructura.

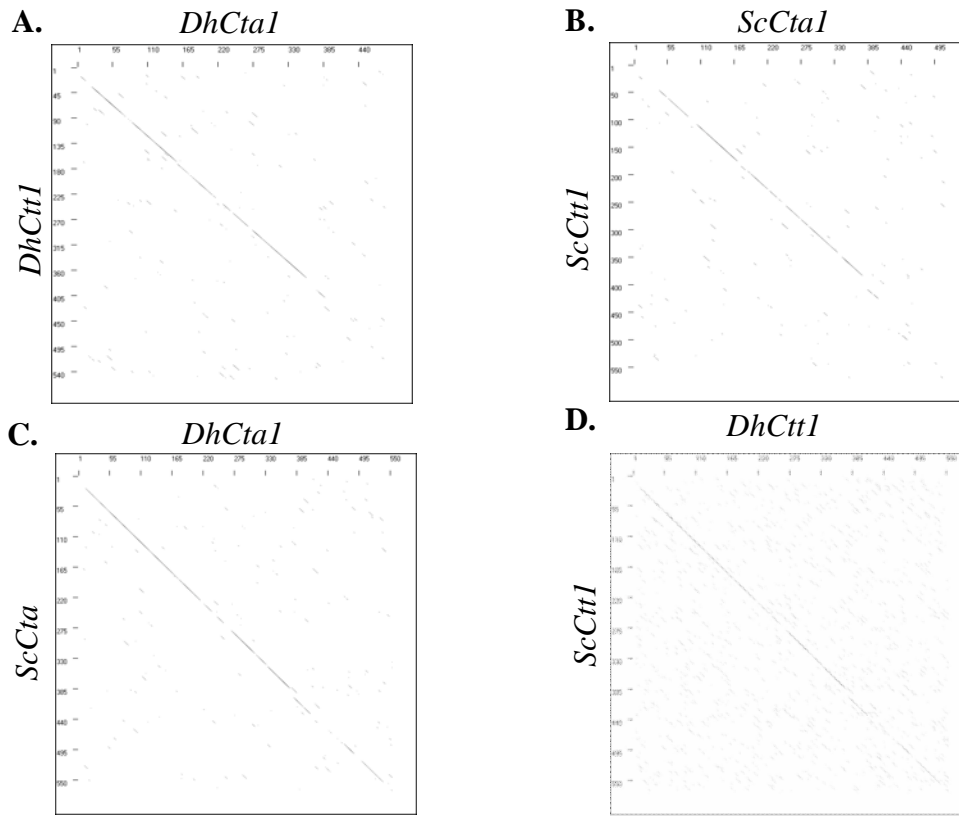


Figura 20. Comparación de las secuencias proteicas de las catalasas de *D. hansenii* y *S. cerevisiae*. Pánel A. *DhCta1* vs *DhCtt1* (51% de identidad); B. *ScCta1* vs *ScCtt1* (39%); C. *DhCta1* vs *ScCta1* (68%); y D. *DhCtt1* vs *ScCtt1* (52%).

Los alineamientos fueron analizados en diferentes sentidos. Uno de los resultados más interesantes se obtuvo al comparar las secuencias parálogas en ambas levaduras, esto es, *DhCta1* vs *DhCtt1* y *ScCta1* vs *ScCtt1*, mediante matriz de puntos (dot-matrix). Para construir una gráfica de matriz de puntos, las dos secuencias se colocan a lo largo de la fila superior y de la columna de la izquierda de la matriz de dos dimensiones y se coloca un punto en cualquier lugar en el que los caracteres en las columnas correspondientes coincidan. Algunas implementaciones varían el tamaño o la intensidad de los puntos en función del grado de similitud de los dos caracteres, para dar cabida a las sustituciones conservadas. La gráfica de puntos de secuencias muy estrechamente relacionadas aparece como una única línea a lo largo de la diagonal principal de la matriz. En la figura 20A se muestra el resultado del análisis de las secuencias parálogas de *D. hansenii*, que tienen una identidad de 51%. El mismo análisis pero utilizando las secuencias parálogas de *S.*

cerevisiae mostró sólo un 39% de identidad (20B). Si se comparan las secuencias ortólogas, es decir *ScCta1* con su contraparte en *Debaryomyces*, *DhCta1* (figura 20C), la identidad se eleva hasta un 68%, lo que indica que hay una presión selectiva para conservar la secuencia entre ambos organismos. Del mismo modo, aunque en menor porcentaje, la identidad entre los parálogos *CTT1* de *Saccharomyces* y *Debaryomyces* es mayor que entre los parálogos de la misma especie: 52% (figura 20D). Ahora bien, de los árboles mostrados más arriba, se deduce que la similitud de *D. hansenii* es mayor con las *Candida spp* que con las *Saccharomyces spp* (exceptuando a *C. glabrata*, que en realidad no es correcto denominarla *Candida*). En la figura 21 se muestra el resultado de la comparación de la *DhCta1* con la catalasa 1 de *Candida albicans*, *CaCat1*. Entre estas secuencias ortólogas la identidad es de un 83%.

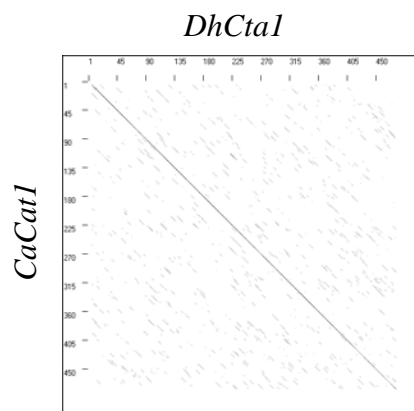


Figura 21. Comparación de las secuencias proteicas de la catalasa A de *D. hansenii* y la catalasa 1 de *C. albicans*, estas secuencias ortólogas tienen una identidad del 83 %, por eso la línea diagonal es muy evidente.

V.5 *Debaryomyces hansenii* tiene dos enzimas con actividad de catalasa con diferente movilidad electroforética

Tras identificar que *Debaryomyces hansenii* parecía tener dos proteínas con actividad de catalasa, se establecieron las condiciones para observarlas a través de la tinción de la actividad en geles nativos. Para ello, se cultivó a *D. hansenii* en YPD y se prepararon extractos crudos de células tomadas a las 6, 12, 24 y 48 horas de crecimiento. Se calculó la concentración de proteína mediante Bradford y se cargaron 20 µg de proteína total en cada carril de un gel PAGE que fue corrido en condiciones nativas. Tras la electroforesis, se tiñó

para observar las bandas con actividad. En la figura 22 se muestra el resultado: la banda que migra más arriba (probablemente correspondiente a *DhCta1*) se observa en todas las condiciones, mostrando ser constitutiva en estas circunstancias, mientras que la banda de abajo (probablemente *DhCtt1*) aparece a medida que el cultivo envejece.

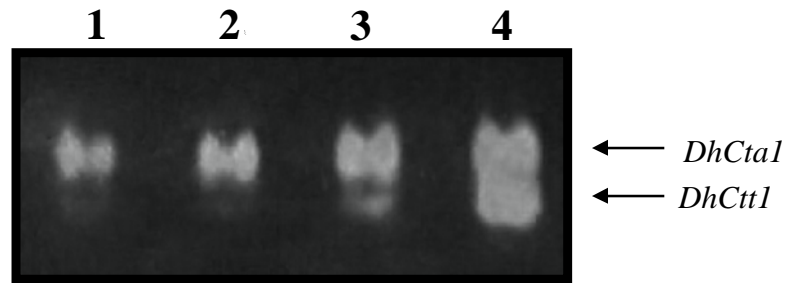


Figura 22. Zimograma de *D. hansenii* cultivada en YPD. Carril 1. extracto crudo preparado a las 6 horas de cultivo; carril 2, 12 horas; carril 3, 24 horas y carril 4, 24 horas de cultivo. Se cargaron 20 μ g de proteína total por carril.

Con el fin de analizar la actividad de catalasa observada tanto mediante esta técnica como cuantificada en un espectrofotómetro, se cultivó a *D. hansenii* en YP y diferentes fuentes de carbono: glucosa, etanol, metanol y glicerol, con y sin NaCl 0.6 M y se prepararon extractos crudos de las células obtenidas en fase exponencial y en fase de crecimiento estacionario. En la figura 23 se muestra el resultado de la tinción y sorprendentemente, la banda de abajo, la catalasa T, sólo se aprecia en YPD sin sal en fase estacionaria. En todas las demás condiciones la única banda que se observa es la que correspondería a la catalasa A.

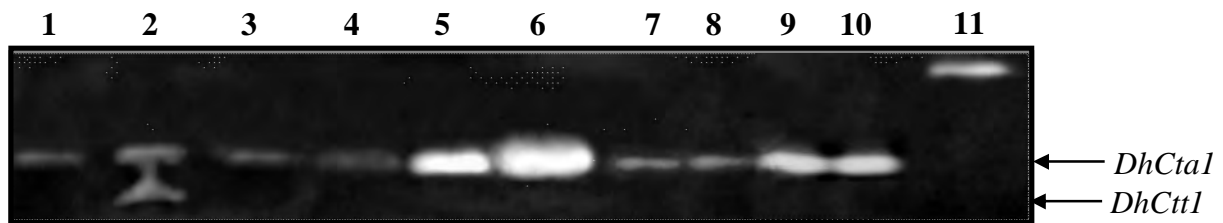


Figura 23. Zimograma de *Debaryomyces hansenii* cultivada en YP y diferentes fuentes de carbono, hasta fase exponencial (exp) o estacionaria (est) de crecimiento, con o sin sal. Carril 1. YPD exp; 2. YPD est; 3. YPD-NaCl exp; 4. YPD-NaCl est; 5. YPE exp; 6. YPE est; 7. YPE-NaCl exp; 8. YPE-NaCl est; 9. YPMetOH est; 10. YPGlic est; y 11. Catalasa de eritrocito humano.

V.6 Las catalasas de *Debaryomyces hansenii* muestran actividad diferencial dependiendo de las condiciones de cultivo

Los resultados anteriores muestran que en la fase de cultivo estacionario, cuando las células se cultivaron en glucosa como fuente de carbono, la actividad de catalasa determinada en el espectrofotómetro es debida a la presencia de las dos proteínas con actividad de catalasa; sin embargo, cuando los cultivos provienen de fase estacionaria y fueron crecidos en glucosa y NaCl, en los zimogramas no se puede apreciar la presencia de *DhCtt1*, evidenciando que la actividad medida es debida únicamente a la catalasa A. Esto sugiere que *DhCTT1* podría tener un patrón de expresión regulado diferencialmente, que resultaría en una represión de su expresión durante el crecimiento exponencial y en presencia de NaCl. En la tabla 9 se muestra el resultado de la cuantificación de catalasa en los mismos extractos que fueron sometidos a la electroforesis. Asimismo, se encontró que la actividad de las muestras preparadas a partir de cultivos crecidos en fase exponencial y estacionaria de crecimiento usando etanol como única fuente de carbono, mostró un incremento de entre 4 y 7 veces con respecto a la de sus equivalentes en glucosa y que este incremento no se observa si el cultivo contiene etanol y sal, sugiriendo que la actividad de catalasa A de *D. hansenii* está regulada positivamente por la fase de cultivo y que este efecto se incrementa en fuentes no fermentables de carbono; este efecto de regulación positiva resulta escondido por la regulación que también ejerce el NaCl. De manera que analizando los resultados de actividad, tanto cuantitativos –analizados por la actividad específica de catalasa–, como cualitativos –analizados por la tinción directa de la proteína nativa–, se propone que la actividad de catalasa codificada por *DhCTA1* es regulada positivamente por la fase de crecimiento y por las fuentes de carbono no fermentables.

Tabla 9. Actividad específica* de catalasa de <i>Debaryomyces hansenii</i> crecida en medio rico con diferentes fuentes de carbono, con y sin sal, en fase exponencial y estacionaria								
Fase de crecimiento del cultivo	Glucosa (YPD)		Etanol (YPEtOH)		Metanol (YPMetOH)		Glicerol (YPGlic)	
	-	+	-	+	-	+	-	+
0.6 M NaCl	-	+	-	+	-	+	-	+
Exponencial	0.7 (±0.2)	1.2 (±0.2)	3.8 (±0.2)	3.6 (±0.4)	0.9 (±0.2)	2.1 (±0.3)	0.9 (±0.06)	1.2 (±0.3)
Estacionaria	1.5 (±0.2)	0.4 (±0.2)	10.5 (±1.0)	2.0 (±0.5)	8.7 (±1.7)	1.0 (±0.1)	0.87 (±0.1)	1.3 (±0.2)

* (mmoles de H₂O₂oxidado/min/mg de proteína)

V.7 Obtención de RNA total de *Debaryomyces hansenii* en diferentes condiciones de cultivo

Así, se decidió analizar a qué nivel ocurría el incremento en la actividad de la catalasa. Para ello, se obtuvo el RNA total de *Debaryomyces hansenii* cultivada hasta fase exponencial y estacionaria en YPD, YPD – NaCl, YPE y YPE-NaCl. Fue necesario probar varios protocolos para lograr obtener RNAs íntegros, ya que el RNA purificado de los cultivos de etapa estacionaria, sobre todo cuando se usaba etanol como fuente de carbono, mostraban un muy alto grado de degradación. Finalmente, utilizando la acción combinada del material y reactivos tratados con DEPC y el RNA mantenido siempre en presencia de ácido aurintricarboxílico como inhibidores de la acción de RNAsas, se logró obtener RNA de buena calidad (figura 24) para llevar a cabo análisis tipo Northern blot, para lo que el RNA fue corrido en electroforesis desnaturizante y transferido y fijado a una membrana de nitrocelulosa.

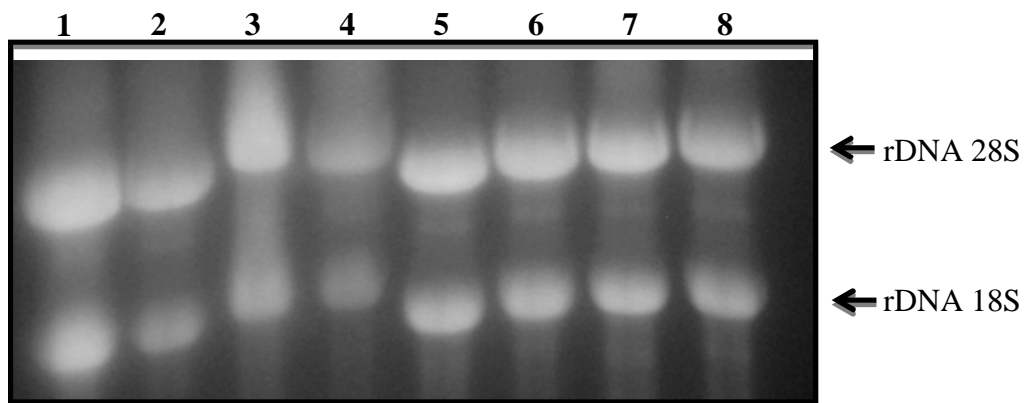


Figura 24. Purificación y electroforesis de RNA total obtenido de *D. hansenii* cultivada hasta etapa exponencial o estacionaria, en medio rico con glucosa o etanol como fuente de carbono y presencia o ausencia de NaCl. Gel desnaturizante teñido con bromuro de etidio. Carril 1. YPD exp; 2. YPD-NaCl exp; 3. YPD est; 4. YPD-NaCl est; 5. YPE exp; 6. YPE-NaCl exp; 7. YPE est; 8. YPE-NaCl est.

Para analizar la expresión de los genes de catalasa, primero se diseñaron cebadores que permitieran amplificar de manera independiente a las dos enzimas. Se diseñaron también con la intención de clonar ambos genes, así que se buscó que pudieran ser insertados en el plásmido pRS316, que es un vector lanzadera originado de pBR322, que contiene un origen de replicación de *Escherichia coli*, el gen que codifica a la β -

lactamasa, secuencia CEN6 ARS4 para su replicación en levadura, el gen URA3 que servirá como marcador de transformación, ya que la cepa acatalasémica que se utilizará como receptora de la transformación es ura^- , y se buscaron 2 enzimas de restricción que estuvieran en el *polylinker* del plásmido, pero no en las secuencias de *D. hansenii* que se pretenden clonar. Las enzimas seleccionadas son *Bam*HI y *Sal*I.

De modo que se diseñaron los oligos para amplificar las secuencias de *DhCTA1* y de *DhCTT1* a partir de DNA genómico de *D. hansenii*, pero conteniendo además sitios de corte para estas enzimas.

Para *DhCTA1* (figura 25) se buscó un par de *cebadores* con una temperatura de fusión (T_m) muy similar (64.74, 47.62% de CG para *río arriba* y 66.64, 52.38% de CG para *río abajo*), con el que se amplificarían 2,607 bases, incluyendo las 1,458 pb del gen, más 217 bases del 3' UTR (extremo 3' que se transcribe, pero no se traduce, Unstranlated Transcribed Region) y 932 bases del promotor, asegurando que no hay sitios de restricción para *Bam*HI ni *Sal*I en el producto amplificado. Una vez localizadas las secuencias de oligos adecuadas para funcionar como *cebadores* de la reacción de amplificación, se diseñaron los oligos, de manera que el *río arriba* tiene la secuencia 5' - (GC)₃ + *Bam*HI + cebador - 3' mientras que el *río abajo* contiene 5' - (GC)₃ + *Sal*I + cebador - 3'.

Para *DhCTT1* el diseño fue similar (figura 26): se buscó un par de *cebadores* con T_m parecida (64.95, 45.45% de CG para *río arriba* y 64.7, 47.62% de CG para *río abajo*), con el que se amplificarían 3,174 bases, incluyendo las 1,674 pb del gen, más 333 bases del 3' UTR y 1,167 bases del promotor, asegurándonos de que no había sitios de restricción para *Bam*HI ni *Sal*I en el producto amplificado. Una vez localizadas las secuencias de oligos adecuadas para funcionar como *cebadores* de la reacción de amplificación, se diseñaron los oligos, de manera que el *río arriba* tiene la secuencia 5' - (GC)₃ + *Bam*HI + cebador - 3' mientras que el *río abajo* contiene 5' - (GC)₃ + *Sal*I + cebador - 3'.

Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*

DhCTA1. ATG – TAA (gen): 1458 pb

Promotor: 932 pb

3' UTR: 217 pb

Tamaño del amplicón resultante: 2607

bases, ningún sitio de corte para

*Bam*HI ni *Sal*I

```

TTTAGCTATGACTATATATGTCTAATTGACTCGTATTTCATGACGTAATCATTTGGTCCTATGTAGAACATCGCTTCTTGGCCCCATTACCAT
TTTTACCACATGAGGCCACCGTCCGCATTTCCAATATACCTGAAAGCCACACCTTTTGTGATTATGGGCCGACGTCAATTTTCCCTCCTC
GGCATGTGTAGCCACTAGCTAGATGCAACGTATCAAAGAATAACAAGAAAGATGAATTTCCGAATTGAGACCGCCCGTTTGTGGCCTATCG
TAGTTACTGGGTGAGCTACTATATCCTATAAATTTAAAACCTTACTTTGTTCAACAACFCATATTTTGCATTTCAGACGGCCAGCCAAATTCCTA
ATTCTAATTTCTAATTTCTAATTTCTAATTTAAATGTCTACGAATATCACATAACGTAACCTTGTAAAACCTTCTCTGATCTTGATTTCCACCCCATC
ATGTATATTTCTAAACCTCTTCTCAAGCGTTGTTCTATTTCTAGTAATCTGTACCGATGGTGGTCTAGTATTCAGCATTAATAATCGTCGGC
CATATCGGGTTGACACAAATCCGGAACCGCGCTCTGATAGATTTGTGGAGAAAAAACCAGTTCTTACATGGCCCTCATCTACAGTACTGA
AGTTTTAGAACTAGATAGTCCACACTTCAAAGTTTGGTCAATAATCCGCTACTTCTTGTATGATGGTGTCAAGGGCTCCTCGCATACCTG
TAGGATGTAGAAATGGACCGTACGTCCTCAATTTGTCTAGAACTCTGCTTTTCTGAACCCAGGGTCCCCTTGGTGCATGCTGGAGTGC
GACTTATACCTCGGCTATCTACCCTCAAATTCGCTGGCCACTTAGAAGCATTTTATTATAATCAGCCATTCACCCCGCTTACCTAAAATTAC
TACGTGATGATATATAAGGAGAATAAATCCTCTTAGAGATTTTAAAAGGTATCATACAATCTCATCAATTACAGGTATATTTAATACAAAC
TATTTCACAATGGCTCTGTTTACACTAATCCACCGGATGTCCAAATCCAGAACCATTGCTACTCAAAGAGTTGGCCAACTGGTCCATTA
TTATTGCAAGATTTCAATCTTATTGATTTCTTAGCACACTTCGACAGAGAAAGAAATCCAGAAAGAGTTGTGACCGCCAAAGGATCTGTGTG
TTACGGTTACTTTGAAGTACTGACGATATAGTGTGTTGTAGTGTGCATTTTGGTAACTATTTGGTAAAAGACCAGGTTTTAAACCA
GATTTCCACCGTTGGTGGTGAATCTGGTTCTGCTGACAGTGTAGAGATCCAAAGAGGATTTTCTACTAAGTTGTATACCGGAGGAGGTAAC
TFGGATTTAGTGTACAACAACACCCAGTTTCTTTCATTAGGGACCCATCCAAGTTCCCTCACTTCATCCATACCCAAAAGAGAAACCCAGA
AACTCACTTGAAGGCCCAACCATGTTCTGGGACTACTGACTTCTAATCAAGAATCCATCCACCAAGTTATGACTCTTTTCTCGACCGTG
GTACTCCAGCTAGTTACAGAGAAATGAACGGTTACTCTGGTCCACTTACAAGTGGTCCAACAAGAGGGTGAATGGTACTACGTCACAGTC
CACTTCATCTCCGATCAAGGTGTCAAAAACCTTGACCAACGAGAAGCAGGGCAATGGCAGGTTCCAATCCAGATTTTGTCTCAAGAACTT
GTTCAAAGAAATTGCCAAAGGTAATGCGCCATCTGGACTTGTACATCCAACCATGACTCAAGAACAGCTAAGAAGGCACCATTCTCCG
TCTTCGACTTAAACCAAGGCTGGCCACATAAGGATTACCCAATGAGAAGATTCGGTAAATAGTCTTGAACGAAAACCCAAAAGAACTACTTT
GCCGAAATGAGCAAGCTGCATTTGCACCTGCTCACACCGTTCTTACATGGAAGCTTCTGCTGATCCAGTCTTGGCAATCAAGATTTATCTC
TTACGCTGATACACACAGACAGATTAGGTACCAATTACACCCAAATTCCTGTTAAGTGTCCAAATCACTGGTGGTTTTCTCAATCCACATA
TGAGGGATGGTGGTATGAATGTTAACGGTAACTTAGGATCACATCCAAACTATTTAGCCACTTCCAACCAAGTTGAATTCAGAAATTTTATG
ATACAAGAAGAACAGAAATTTGGGAAGGGGCTGCTTGTCCATCCACTGGAATGTACTGACAAGGATTACTCCCAAGCTACTGCTTTATA
CAATGTTTTAGCTAAGTATCCAAACCAACAAAAGAACTTAGCTCACAACTGCTGTTTCTCATGTTTCTGGCGCTGAAACTCATATCCAAGACA
AGGTCTTTGATATGTTTCGCAAGGTCACCCAGAATTATCCGCCAACATTAAGAAGGAAGCTTTACAACCTTCTCCAAGAAAGTAAATAGGT
TATCTAATTAAGGTTATGTATTTATATCTATTGTGAATCAATATTTATTTATTTTGTATTTTGTAAAGGAAACAGAGGGATTCAGATA
ATGCAGTATATTGACCCATAGAAAACCTTAGACAACCTTCTGTTAAACATTTAGAGTCAATTAAGCAAGTTTAAATAGCTACCATATGCTGGTC
TCAATAGCAGCTCTAGCCGGAATTAGAATATATTTATTTATAATTTTGTAGTATTACAAGATTTACATGCACAGGCTGACCCGCACTTGCA
AGATGTACCACAGCATGACGACGTAATCTTTGAGCTAGAAGAATTGGATACACTTGTACTTGTATTTGTACTTGAACCTTGAATTTACTTCTT
    
```

Cebador	Secuencia	Tm	% GC
Río arriba	gcgcgcgatccatthttaccacatgaggcc ✂ <i>Bam</i> HI	64.7 °C	47.6
Río abajo	gcgcgctcgactaatttcgggctagagctgc ✂ <i>Sal</i> I	66.6 °C	52.4

Figura 25. Secuencia de *DhCTA1* obtenida de la secuencia del cromosoma F de *D. hansenii*, en la base de datos de genolevures (<http://www.genolevures.org>) y diseño de cebadores para la amplificación del gen completo, incluyendo ~1,000 pb del promotor y ~200 pb del 3' UTR

DhCTT1. ATG – TAA (gen): 1674 pb
 Promotor: 1167 pb
 3' UTR: 333 pb
 Tamaño del amplicón resultante: 3174 bases, ningún sitio de corte para *Bam*HI ni *Sal*I

```

AATAGCATTAAAATATCCATGGGGCAGTATATAAAGGATATTACTGCCACTGCATTCAGGGCATTATAGTAAATCTGATTTTTTTTACTATATTTGAGTTCCTCAATGGCAGGTTTACATTA
GGTAATTACTAAGAAATGTGATTTATCACAATTCATTTGGAATACAAGACATTTATTAGGCATTTATTTGGAATATAAGCACATAAATTAATTTTATTAATAAATACTCTGTTTGAATGGTG
ACAAGTTAGACTTTAGAAAAATTTTATAAACTCTAATACCTCTTACAGAAAIACTTCAGATAATAATGTAGGTAATATAGCCCAATTAATCTAGGATATATCTCTGCTGACTTAGTAGA
GTCCAATACATTAATAATATGCTATATTTGCACATCAAGATTTTTCATCTTATCCAAATCAATCTAAATTTGAGATTACACACAGTTATATTTGAAAATCACTTATCTCATAAATTAAGTTGAT
AATTGGGTAATATATGTTGCCACAGTTGTTTAAAGAGAAGATATGTACGTGTGGTTAATTTGTTGCAATATATCTGGTTATCTCACACACTCCACTAACGTATAATGCTGTAATTTATC
GTTGGTATGCATAAGTGAGCTTAAAAAAGGTTTGGACATTTTCAATTGATTCGGACTTCGTTCCGGCTTTGGAACTTCGTATGATGAATGATCGTTTAGCGGATTAATTAGCAATACAA
TATTTGAGTTGCTGTTAAGCAAAAGAGATATTACGTCATTTATTAACACATCCACTATTAGTAGACTTCCAAACAAGGCTTCCAGTTAAGGATAGGTCATTTGTTGCTGACCTGATTT
CACGTTTTTAAAGACCACAACACTCTTGAATATGTTCAATTTCCCTGTAATCAATTTTTATCTTTTTTGTGTGATTAGTTCAAAGTATAGTAATTCGTCGATCTATGACCAATAGCAAC
AATCGAATTTCAAATATCATGATTTCAACTTCAGAAAAATTTCCTAACCTGTAATATAGGTAATATGCAGCAATATCAGCGATATCTGACTAATATAGGCGATGTTCTAGAAAAGTGAGAC
ATAGCTTGCTATAATTGAGTTAGTTGCTATAATGAAGGCTATAAAAACGACTGCCTAGCACACATTTAGAATTAGCTTAAACAAAATCTAATCTGCTTATTTGTAATAATGCTTTCTGAATACA
TTCAAAAATACGAAGAAGATCCAGCAGTACTCAACTCCCAATGGAGTTCCTTATGCCAATCATCCATATGGTGGCCAAAACGGCAGGCTTGGCGGGCTTATTTGTAATGATTTAAT
TTGATGGACGACATTTCTCACTTCGATCATGAAGAATCCCGAAGAAGTGTTCACGCAAAAGGTGGTGGTCTCAGGATATTTGAAATGACTGATTCATGCTGATTTAACTTATGC
CCGTCCTTACAAATCCCAAGGCTATAAATGCTGATCAGTTAGATTCTCTACAGTTGGAGGTGAAAGGGGTACACCGGACACAATAAGAGATCCAAAGGGGTTCTCAATTAATTTGAAA
CTGACATTTGGTAATAGGATTTGGGTTTTTAAACAATACACCAATCTCTTTATTAGAGACCCGATTAAGTCTCCAAAATTTATTCACACCCAAAAGAGAGATCCATCTACAAAACCTTAATCAA
TTAACTGATCCATACCATACTTGGGACTACTTTATTAGAAATCTGAAATGCTTACATCAAAATCACTTACATGTTTGGTAAAAGGGGTTTCCAAAGAGTTGGGCGAAATGCACGGATATTC
GGGTCATACATTTAACTAATTTAACGATAAAGATGAAATTAATTTACATGATCCATTTCTGCTGATGGAGGTTTTGACGGCTTTAGTGACAAAAGAGGTAAGAGTTGGCTGCTGATCA
CACCTGAATACAACACTAAGGATTTATATGAAGAATGCTGCTGTAATATCCATCATATTCATTTTATGTTCAAACGATGACACCTAAACAAAGCTGAAGAATTTGCTTATCTATCAAT
GATTTAACAAAAGTATGGCCTCACAAGAATTTCCCAATTAAGAAGATTTGGCCGATGTTTTAGATAAGATCCGGTAAATTACCAGATGAAATGACAAAATTTGCTTTTCCACCTGCTCA
TTTAGTTCGGGATTTGAGCTTCAAATGATCTGTTTTCAATCTAGGTTATACTCTTACTCTGATACACATCGTATAGATTAGGGCCCAATTAACCAAGATACCAGGTTAACAAAACCA
GGACATTTGATAGTAATTTCTGGATGCTCCATTTTACAGGTAATTTCAAAGAGAAGGGATTGCATCTATTGATAATCAAGGATCTAGACCTAATTAATTTGAGTTGCTTATACCTATTAAT
TCTGCTCGAACGATCCAAAGTACATACAGAATGGATTACCACCTGTTGAAGAAAAAANGTATTTAGGTTGTTGTTCCGAAACGATCTACTGATAAATATGAAATTTTACAGAAGAAGCTAA
TTTGAAGGCACATGAAGAAAAATTTGGCTCAAATCGTATGACATATTTCTGGATTIAGTGAGCTAGATGTTGAACGCCAAGGCCCTTATAAAAAATTTATTAGTAAGCAAGATANAG
GGGATTTATAGAAGCTATTTGTTGACATGCACTGAAAAAAGAGTTCCTCAAATAAANGAAGAGTACCTCAGTTATGGGTTTGTATAGACGGGGATTTAGGAAGTGAAGTTGCTAAAGG
TTAGGAGTAAGTTACAAGCACTTACTCTTGAACGAATATATCGAAGATCTTGGAAATAGCTCTGCTAACATAAATTAATCTACGTATATCTGACGAATATTTTAAATGAAAACATTTTA
AGTTGAACAAAATGATAATTTTACATATAATGTTGAATTAGGTAAGAAAGATTTTCATAAAGATTTTGTCTATTTCTGTTTATGTAAGAAAGATTTAGATACGACTATTAGGGTATTA
ATAGCAGTTCTGCTTCAAGAGAGAAATCTGAATATATTTTATCTAATTTGACAAATTTAATAAATAAACAGTTACGTTAACCTTGTAGCATTACTTTAAAATTTAAAACCTCTACTAAT
AACTCAACTATTTGTTAAACACAGTGAGTTTCACCAATCGAATGAGTATGCAATTCGGATCTCTCTCAGCCTCAGAGGATGATTTACTTGCTCGGTAGTAGAGCTATTACTTTCTGTA
    
```

Cebador	Secuencia	Tm	% GC
Río arriba	gcgcgcggtatcgtattactgccactgcattcag <BamHI	64.9 °C	45.5
Río abajo	gcgcgcggtcgaccgaatgggtgaaactcactgtg <SalI	64.7 °C	47.6

Figura 26. Secuencia de *DhCTT1* obtenida de la secuencia del cromosoma B de *D. hansenii*, en la base de datos de genolevures (<http://www.genolevures.org>) y diseño de oligos para la amplificación del gen completo, incluyendo ~1,100 pb del promotor y ~300 pb del 3' UTR

Para lograr la amplificación, fue necesario ajustar las condiciones del PCR. Intentamos distintas concentraciones de MgCl₂, encontrando que 2 mM era más adecuada que 2.5 y 5 mM (condiciones “estándar”). Asimismo, fue necesario “jugar” con las temperaturas de apareamiento (annealing). Finalmente, la reacción se llevó a cabo bajo el siguiente esquema:

94 °C - 5´ (desnaturalización inicial)	}	5 ciclos
94 °C - 1´(desnaturalización)		
55 °C - 1´ (apareamiento)		
72 °C - 2´ (extensión)		
94 °C - 1´(desnaturalización)		
60 °C - 1´ (apareamiento)	}	30 ciclos
72 °C - 2´ (extensión)		
72 °C - 10´(extensión final)		
8 °C - ∞		

Se obtuvo la amplificación de un fragmento de ~2.6 Kb para *DhCTA1* y uno de ~3.1 Kb para *DhCTT1* (figura 27). Para usar como control interno, se amplificó una secuencia de *DhrDNA18S* obtenida por Carlos Guerrero en el laboratorio de la Dra. Alicia González, a partir de Govind y cols. 1992.

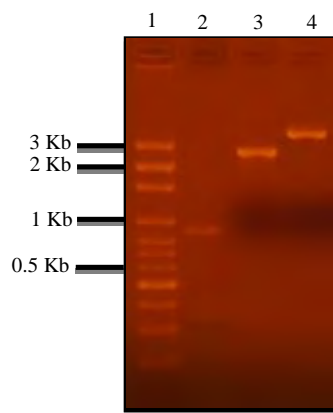


Figura 27. Gel de agarosa teñido con EtBr que muestra los fragmentos amplificados de las secuencias de *D. hansenii*: Carril 1. Marcador de peso molecular; 2. *DhrDNA18S*; 3. *DhCTA1*; 4. *DhCTT1*.

Utilizando estas sondas marcadas con ³²P por *random primed*, se llevó a cabo la hibridación con la membrana de nitrocelulosa que contenía los RNAs obtenidos de cultivos de *D. hansenii* en fase de crecimiento exponencial y estacionaria en YPD, YPD – NaCl, YPE y YPE – NaCl.

V.8 En *Debaryomyces hansenii* la transcripción diferencial de los genes de catalasa está regulada por la fuente de carbono

En la figura 28 se muestra el resultado del Northern blot. En el panel A se presentan fotos de las autorradiografías y en el panel B la normalización por densitometría de estos resultados. Se observa que *DhCTA1* y *DhCTT1* son expresados diferencialmente: los niveles de expresión de *DhCTA1* fueron ligeramente mayores

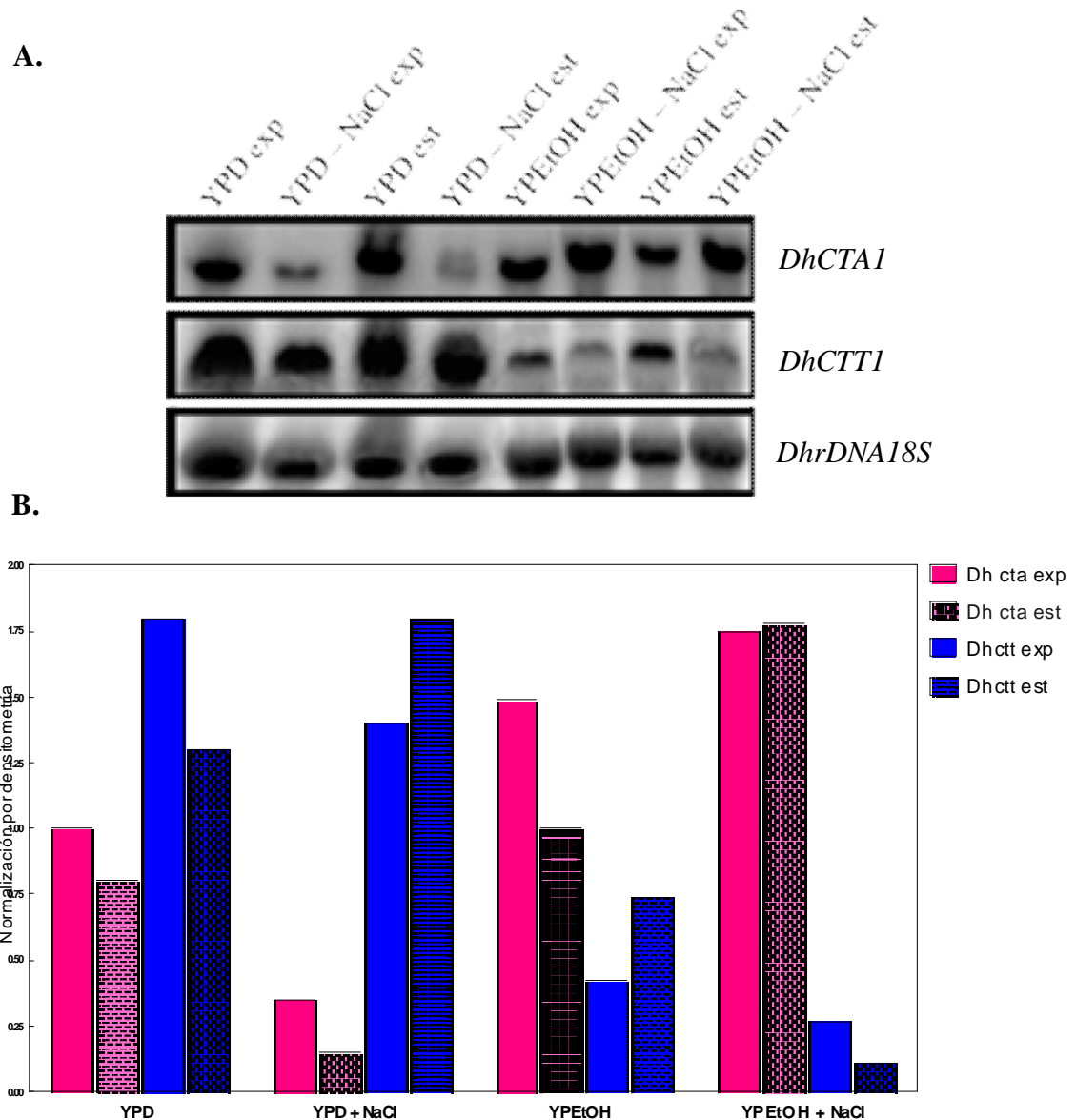


Figura 28. Panel A. Northern Blot de RNA total obtenido de *Debaryomyces hansenii* cultivada hasta fase exponencial o estacionaria en YP glucosa o etanol como únicas fuentes de carbono y con o sin NaCl presente en el medio. En la autorradiografía de arriba se muestra el resultado de la hibridación con *DhCTA1*, en medio con *DhCTT1* y abajo con *DhrDNA18S*. Panel B. Gráfica con los resultados de la densitometría de las autorradiografías.

cuando la levadura fue cultivada en condiciones respiratorias si se comparan con las encontradas en glucosa, igual que como se observó en los zimogramas. Además, la expresión de este gen se reprimió cuando la levadura fue cultivada en glucosa y NaCl, efecto que no se observa en los RNAs obtenidos de células cultivadas en etanol como fuente de carbono. Esto indica que *DhCTA1* es regulada transcripcionalmente tanto por la fuente de carbono como por la sal. Por el contrario, la expresión de *DhCTT1* es alta en condiciones fermentativas y se reprime cuando la levadura es crecida en sustratos no fermentables como el etanol. Cuando hay NaCl 0.6 M, la expresión dependiente de etanol fue aún más reprimida, indicando nuevamente que tanto la fuente de carbono como la presencia de la sal juegan un papel en la regulación transcripcional.

V.9 Purificación de la catalasa A de *Debaryomyces hansenii*

Ahora bien, fue solo hasta tener el Northern blot que se pudo asegurar que las actividades diferenciales analizadas correspondían a una u otra catalasa, esto es, que la catalasa mayoritaria que se determina en etanol como fuente de carbono, con una muy alta actividad específica, misma que se observaba en los zimogramas, correspondía efectivamente a la catalasa A.

Tabla 10. Actividad específica de catalasa de las fracciones obtenidas tras la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
FRACCIÓN	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (mmoles de $\text{H}_2\text{O}_{2\text{oxidado}}$/min/mg de proteína)
Extracto crudo	3,960
Precipitado 0 – 40%	272
Sobrenadante 0 – 40%	397
Precipitado 40 – 70%	4,890
Sobrenadante 40 – 70%	465

El que fuera la única proteína con actividad de catalasa presente en los geles de proteína provenientes del cultivo de *D. hansenii* en etanol hasta etapa estacionaria, nos condujo a buscar su purificación. Se probaron distintas alternativas, empezando siempre por la precipitación con sulfato de amonio. En la tabla 10, se muestra el resultado de estas precipitaciones, de las que fue la fracción 40 – 70 % de saturación la que fue utilizada para continuar con la purificación. Después, esta fracción fue pasada a través de una

cromatografía de exclusión molecular utilizando Sephacryl HR100, cuyo resultado se muestra en la figura 29. Se juntaron las fracciones con actividad y se pasaron a través de una cromatografía de interacción hidrofóbica con fenilsefarosa CL-4B. Como amortiguador de unión se utilizó PBS con 1.7 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y para eluir se hizo un gradiente empezando con 1.7 M y hasta 0 de sulfato de amonio, tras lo cual se obtuvieron las fracciones con actividad (figura 30). En la tabla 11 se muestra el resultado de la purificación y el rendimiento obtenido.

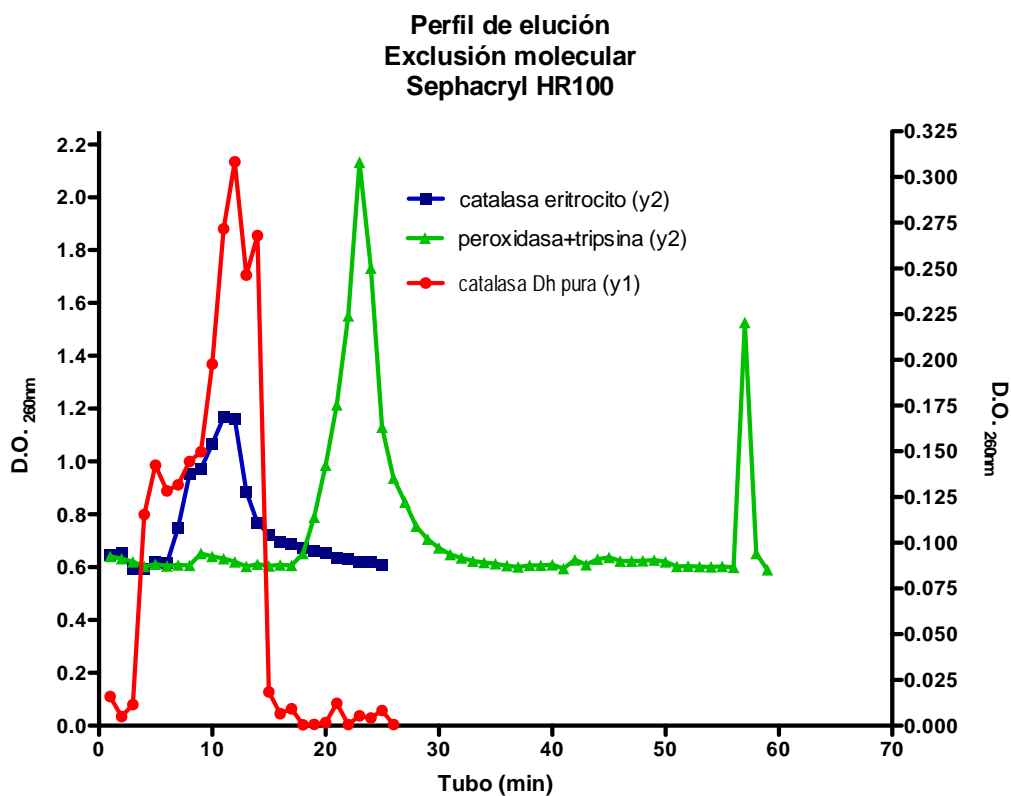


Figura 29. Perfil de elución de la fracción 40 – 70% de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tras pasar por una cromatografía de exclusión molecular de Sephacryl HR100 cuya curva se muestra en rojo. En azul, la elución de una preparación pura de catalasa de eritrocito humano y en verde la elución de los marcadores de peso molecular peroxidasa y tripsina.

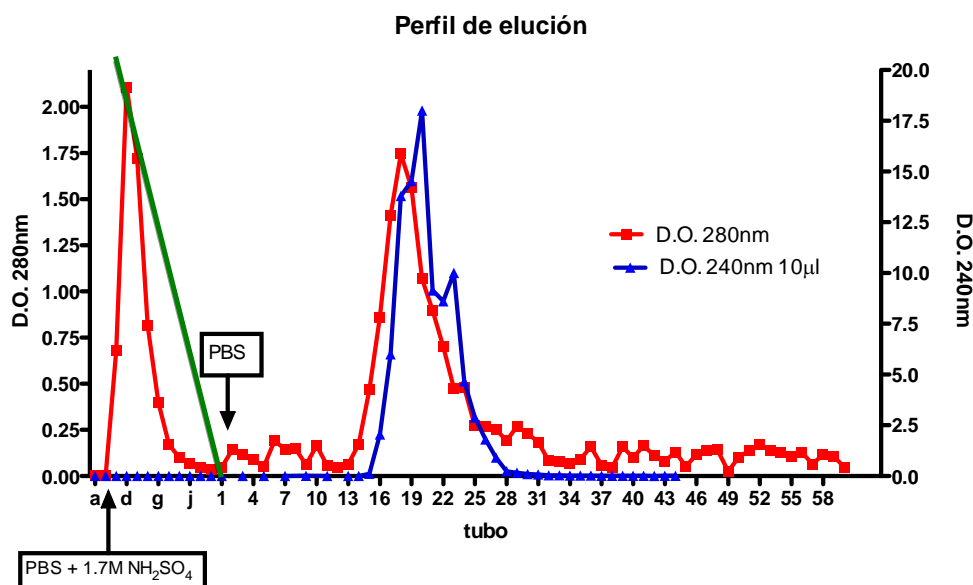


Figura 30. Perfil de elución de la catalasa obtenida de la columna de exclusión molecular tras pasar por una columna de interacción hidrofóbica de fenilsefarosa CL-4B. La línea verde representa el gradiente lineal desde PBS con 1.7 M de (NH₄)₂SO₄ hasta PBS solo que se utilizó para lavar. En rojo se muestra la Abs a 280 nm y en azul la actividad de catalasa en 10 µl de cada una de las fracciones.

Tabla 11. Purificación de la catalasa peroxisómica de *Debaryomyces hansenii*

Fracción	Proteína total	Actividad total *	Actividad específica **	Rendimiento
Extracto crudo	116 mg	459,360	3,960	1
Pp 40 -70% (NH ₄) ₂ SO ₄	22 mg	466,950	21,225	5.4
Exclusión molecular HR100	6 mg	439,998	73,333	18
Interacción hidrofóbica CL-4B	4 mg	503,572	125,893	32

* mmoles de H₂O₂ oxidado/min

** mmoles de H₂O₂ oxidado/min/mg de proteína

Se utilizaron 10 µg de catalasa pura para una PAGE desnaturalizante. En la figura 31 se muestra la banda obtenida teñida con azul de Coomassie. Este gel se llevó al Dr. Guillermo Mendoza Hernández, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM. La banda fue cortada y tratada como se explica en Material y Métodos y analizada por espectrometría de masas. Se encontró que la proteína purificada correspondía a la catalasa peroxisómica putativa (gi|50424473), codificada por *DhCTA1* de *Debaryomyces hansenii*. El puntaje global fue de 1,182, se analizaron 26 péptidos que cubrieron el 63% de la secuencia. La proteína tiene una masa nominal de 54.8 kDa con un pI calculado de 6.47 (figura 32).

Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*

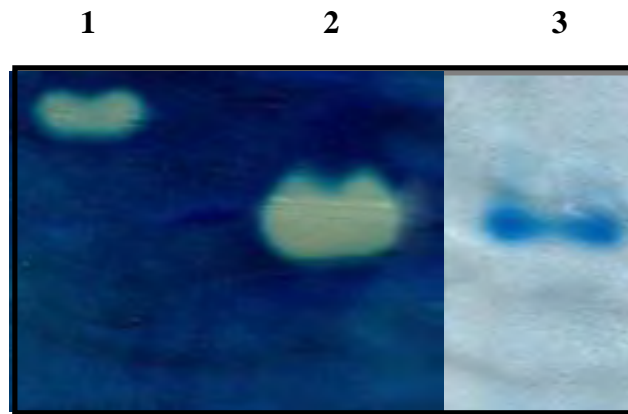


Figura 31. Zimograma de la catalasa purificada de *D. hansenii*. Carril 1. Catalasa de eritrocito humano; 2. 0.1 µg de la catalasa purificada; 3. 10 µg de la catalasa purificada, PAGE teñido con azul de Coomassie.

La identificación a nivel proteína (mediante espectrometría MS/MS) y a nivel genético (a través de la amplificación de la sonda diseñada específicamente para aislar *DhCTA1* del DNA genómico de *D. hansenii*), permiten proponer que la catalasa peroxisómica (*DhCta1*) está directamente involucrada en la detoxificación del peróxido de hidrógeno generado durante el estrés oxidativo inducido por etanol en *Debaryomyces hansenii*.

```

Match to: gi|50424473 Score: 1233
hypothetical protein DEHAOF11550g [Debaryomyces hansenii CBS767]
Found in search of c:\Temp\ms13.tmp
Nominal mass (M): 54836; Calculated pI value: 6.47
NCBI BLAST search of gi|50424473 against nr
Unformatted sequence string for pasting into other applications
Taxonomy: Debaryomyces hansenii CBS767
Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI
Entrez:
gi|49656493 from Debaryomyces hansenii
Variable modifications: Deamidated (NQ), Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 61%
Matched peptides shown in Bold
1 MAPVYTNNG CPIPEPFATQ RVGQHGPIIL QDFNLIDSLA HFDREIRIPER
51 VVHAKGSGAY GYFEVTDIS DVCSAAFLET IGRKTKVLTR FSTVGGESGS
101 ADSARDPRGF STRLYTEEGN LDLVYNTFPV FFERDPSKFP HFINTQKRNK
151 ETHLKDPTMF WQYLTSQES IHQVMTLFSQ RGTPTASYREM NGYSGHTYKQ
201 SNKKGEMYVY QVHFISDQGV KTLTNEEAGE LAGSNPDPAQ EDLFKEIANG
251 NAPSWTCTYIQ TMTQEQAKKA PPSVFDLTKV WPKKDYPMKR FCKLVLEMP
301 KNYFAEIEQA AFAPANTVPY MEASADPVLQ SRLPSYADTH RHRLGTNYTQ
351 IPVNCPTICR VFNPHMRDGG MNVNGNLGSH PNYLATSQPV EFKNFSIQEE
401 QEVWEGAACP FHNKCTDRDY SCATALYVNL ARYPMQOKNL AHNVAHVHVG
451 AETHIQDKVF DMFAKVHPEL SANIKREALQ LSPRK
    
```

Figura 32. Resultado obtenido de la espectrometría de masas aplicada a la proteína purificada; se confirmó que se trata de la catalasa peroxisómica de *D. hansenii* (gi|50424473). El puntaje global fue de 1,182 con 26 péptidos que cubrieron el 63% de la secuencia. La proteína tiene una masa nominal de 54.8 kDa y un pI calculado de 6.47.

V.10 Caracterización cinética de la catalasa A de *Debaryomyces hansenii* purificada

Se llevó a cabo una caracterización de la cinética de la enzima purificada analizando la actividad variando la concentración del sustrato. Los resultados fueron analizados utilizando los métodos Lineweaver-Burk y Eadie Hofstee, obteniendo una K_M^{app} de 44 mM y una $V_{\text{max}}^{\text{app}}$ de 106 mmol/min/mg de proteína, similar a otras catalasas de hongos reportadas (figura 33 y tabla 12).

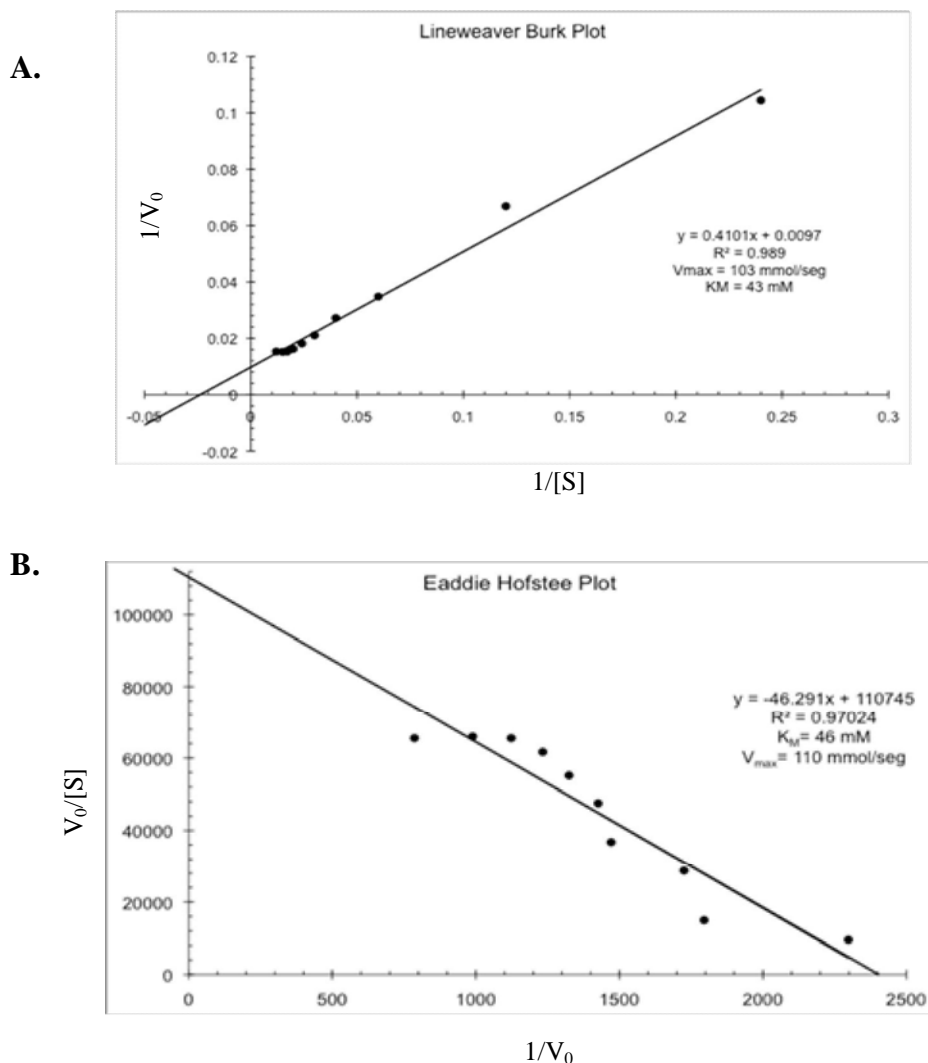
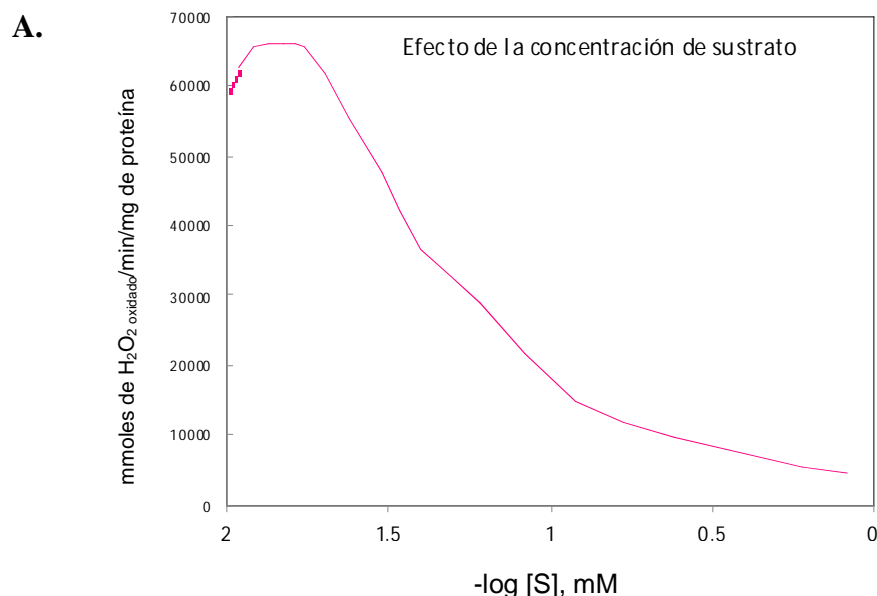


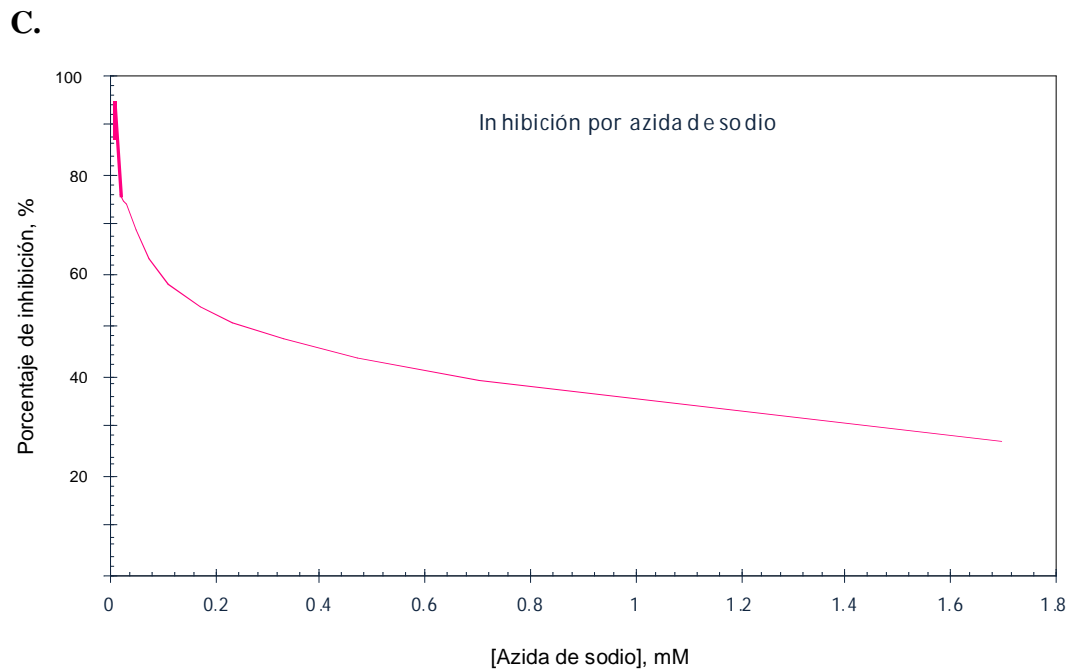
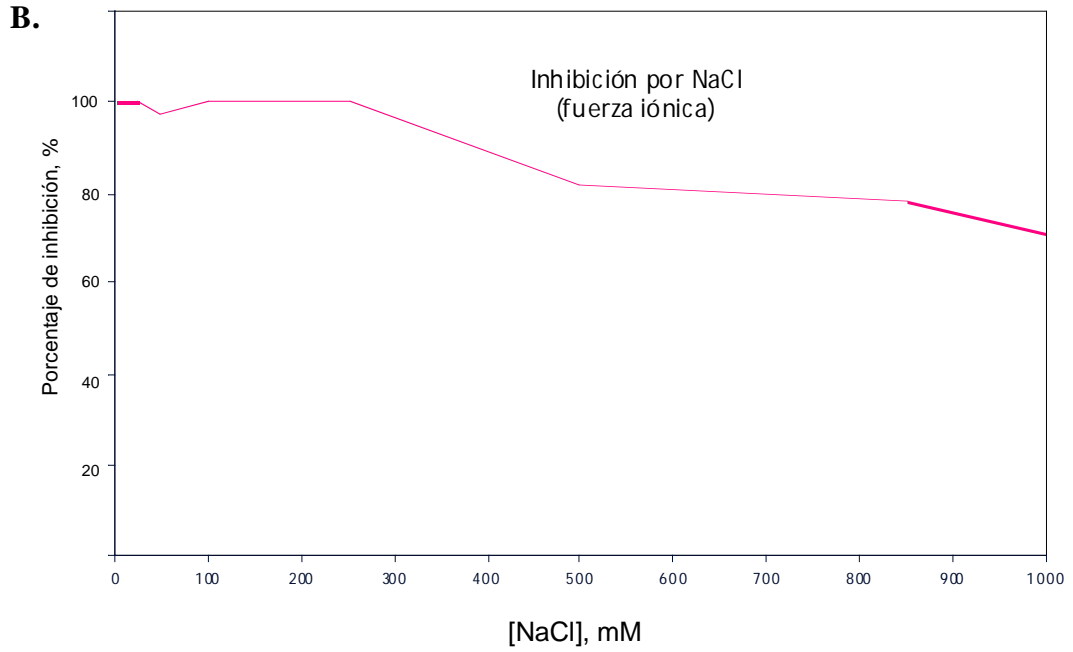
Figura 33. Parámetros cinéticos de la catalasa purificada de *D. hansenii* a partir de su cultivo en YPE. Se calcularon los valores aparentes de K_M y V_{max} mediante el análisis de los datos cinéticos por A. Lineweaver-Burk y B. Eadie-Hofstee.

Catalasa purificada	K_M^{app} (mM de H_2O_2)	V_{max}^{app} (mmol de H_2O_2 /seg)
Lineaweaver-Burk	43	103
Eadie-Hofstee	46	110

También se analizó el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad específica (figura 34 A), así como el posible efecto que pudiese jugar la fuerza iónica sobre la actividad de la catalasa purificada, demostrándose que el NaCl no la inhibe en ninguna de las concentraciones probadas (0.1 – 1,000 mM, figura 34 B). Adicionalmente, se examinó el efecto de algunos inhibidores de catalasa reportados, como la azida de sodio, potente inhibidor que se une de manera irreversible al grupo hemo (Johnston y Delwiche 1965). Efectivamente, este compuesto afectó severamente la actividad, ya que con tan sólo 0.5 μ M de NaN_3 la actividad disminuyó en un 80% (figura 34 C). Asimismo, se probó el efecto de otros inhibidores, como el 3-AT, que no afectó a la catalasa de *D. hansenii* ni aún a concentraciones tan altas como 5 mM (Havir 2003, figura 34 D), ni el etanol directamente sobre la actividad *in vitro* mostró efecto hasta pasar del 10% v/v (figura 34 E). Finalmente, se determinó también el efecto del pH sobre la actividad de la catalasa purificada, obteniéndose una curva de campana, mostrando que 7.0 es su pH óptimo (figura 34 F). La catalasa peroxisómica aislada de *Debaryomyces hansenii* mostró características típicas de las catalasas de levaduras (Mozaffar y cols. 1986, Levy y cols. 1992, Fernandes y cols. 2010).

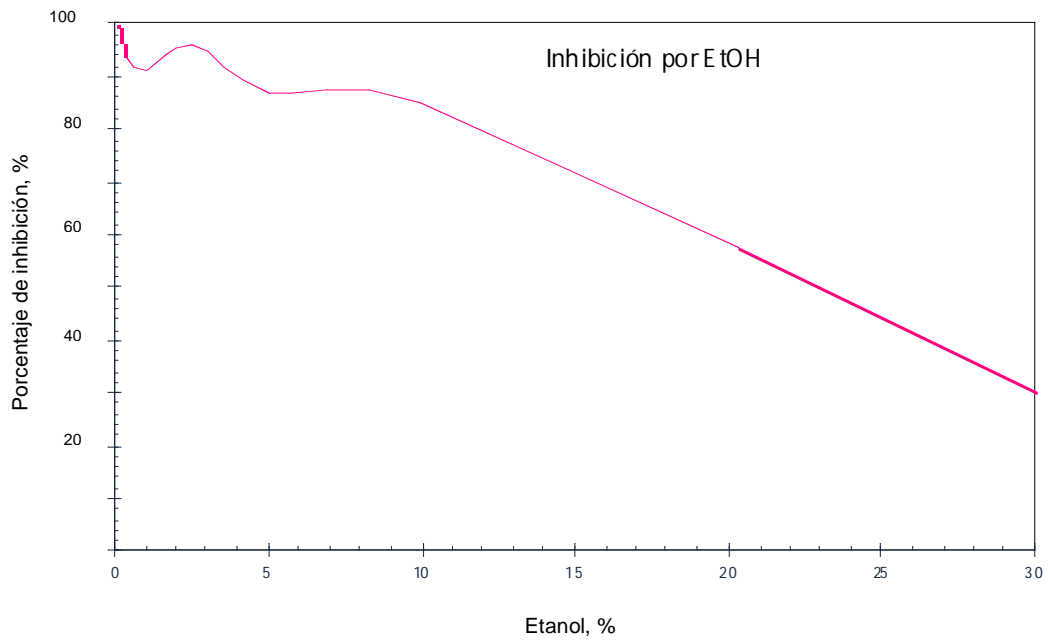


Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*

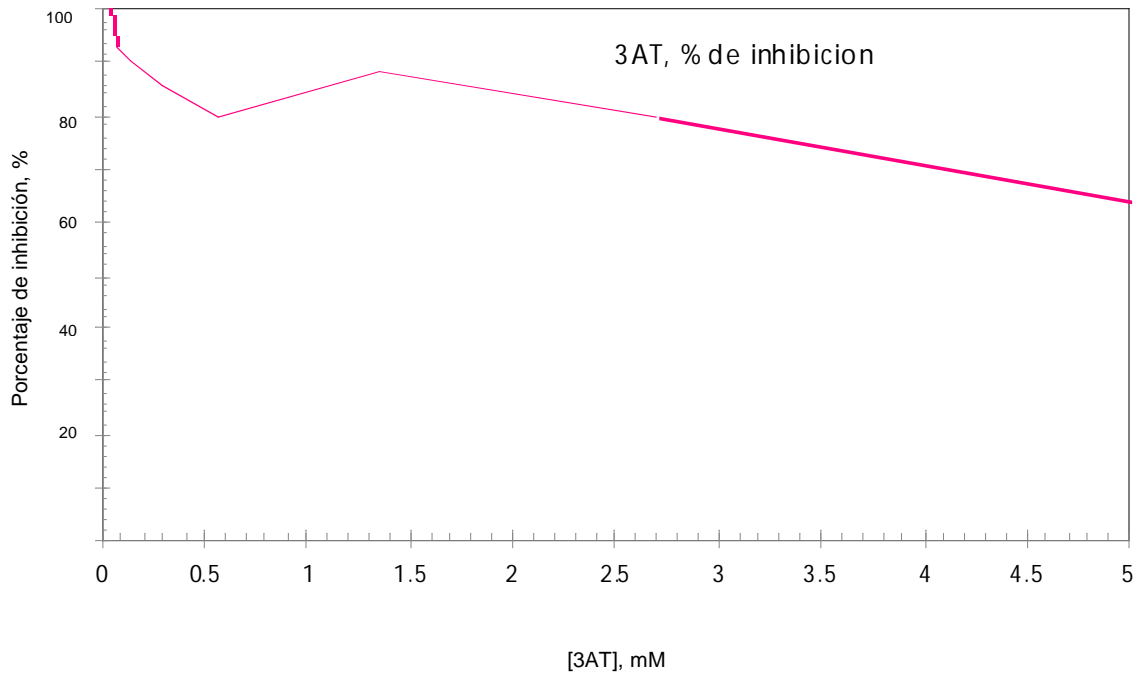


Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*

D.



E.



F.

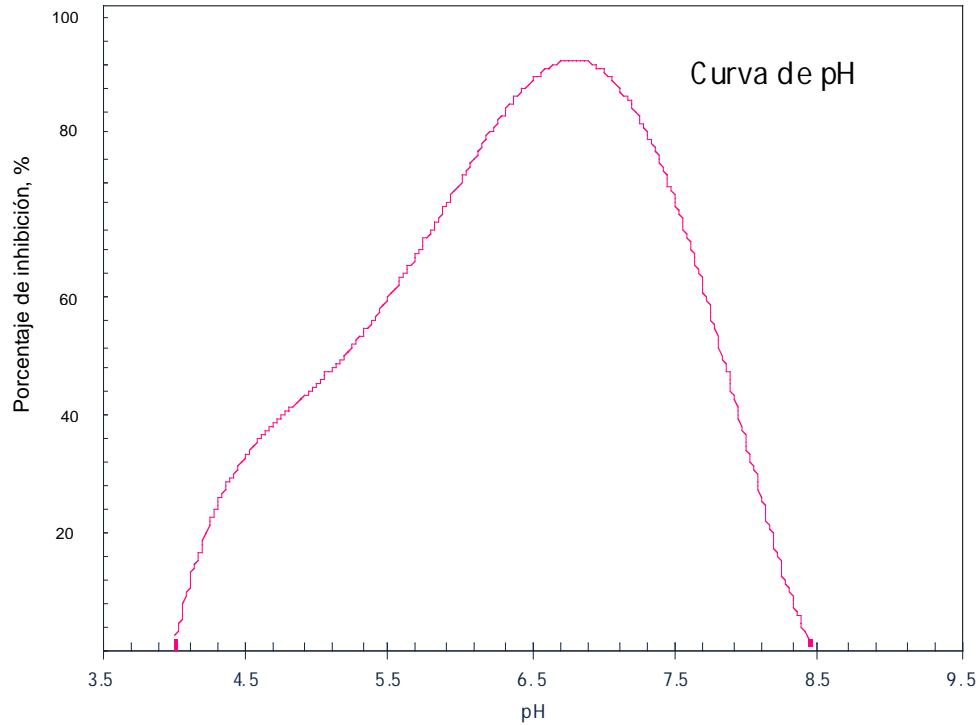


Figura 34. Análisis de distintos parámetros cinéticos de la catalasa purificada de *Debaryomyces hansenii*. A. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad específica; B. Inhibición por fuerza iónica; C. Inhibición por NaN_3 ; D. Inhibición por etanol; E. Inhibición por 3-AT; F. Curva de pH.

VI. DISCUSIÓN

Cuando se cultiva a *Saccharomyces cerevisiae* en medio rico utilizando etanol al 2% como única fuente de carbono, se dispara una fuerte activación de las enzimas antioxidantes, con respecto a la cantidad de éstas cuando el cultivo se lleva a cabo usando glucosa (Luschak 2006). Por el contrario, cuando esta levadura es cultivada en glucosa como fuente de carbono, no hay actividad de la catalasa A, mientras que la T está presente pero en cantidades mínimas. Al disminuir la concentración de glucosa, la catalasa T incrementa su actividad y la catalasa A aparece, también con una actividad alta. Mutantes *petite*, carentes de mitocondrias y por tanto, incapaces de respirar, no presentan actividad de catalasa A (Cross y Ruis 1978). En este trabajo se muestra que *Debaryomyces hansenii*, al crecer en glucosa como fuente de carbono, exhibe una alta actividad de catalasa que se incrementa aún más si el cultivo se lleva a cabo usando etanol como única fuente de carbono y en fase estacionaria de crecimiento. Sin embargo, el efecto positivo que ejerce el etanol sobre esta actividad antioxidante no se observa si el cultivo contenía, además, NaCl, sugiriendo que el estrés oxidativo podría ser menos agresivo en estas condiciones, lo que se refleja en una disminución en la respuesta a estrés determinada por la reducción en la actividad de catalasa, o bien, un menor incremento en la actividad de la enzima con respecto a la condición sin sal, ya que la actividad cuando se usa etanol como única fuente de carbono, es siempre mayor que en glucosa. Esta disminución en el estrés oxidativo se puede sumar a los ya varios reportes sobre un papel protector que jugaría el NaCl contra distintos tipos de estreses en *Debaryomyces hansenii* (Prista y cols. 1997, Papouska y Sychrova 2007, Gori 2007).

Saccharomyces cerevisiae tiene dos genes, *CTT1* y *CTA1*, que codifican para las catalasas citoplasmática y peroxisómica, respectivamente, que ya han sido caracterizados a profundidad (Zimniak y cols. 1976, Schüller y cols. 1994, Ruis y Köller, 1997). A través de una búsqueda por identidad de secuencia sobre la secuencia genómica completa almacenada en la base de datos de *genolévures*, en este trabajo se

logró identificar dos ORFs en el genoma de *Debaryomyces hansenii*, DEHA2B16214 g y DEHA2F10582 g, en el cromosoma B y en el F, respectivamente, que corresponderían a los genes que codifican a los ortólogos de *CTT1* y *CTA1* en este organismo. Asimismo, se identificó a través de PAGE nativo seguido de tinción con ferricianuro de potasio:cloruro de hierro, la presencia de dos proteínas de diferente movilidad electroforética con actividad de catalasa. Se evaluó la actividad específica de catalasa utilizando el método espectrofotométrico y se encontró que la actividad de la levadura eurihalina es más alta que la actividad de *S. cerevisiae* cuando ambas levaduras fueron cultivadas en las mismas condiciones. Los análisis en zimograma, a pesar de que no son cuantitativos, permitieron observar que la actividad de *DhCta1* es aún más alta cuando se cultiva a *D. hansenii* en medio rico usando etanol como única fuente de carbono y que dicha actividad aumenta con la fase de crecimiento, siendo mayor en fase estacionaria, y que en presencia de NaCl este efecto no es apreciable, observándose una actividad de catalasa disminuída. Indudablemente el NaCl reduce el estrés, pero no lo elimina. Asimismo, se probó mediante Northern blot que la mayor actividad de catalasa corresponde a un mayor nivel de RNA mensajero del gen que codifica a la catalasa A; sin embargo, el efecto negativo que se observaba en los zimogramas ejercido por el NaCl, no correlaciona con una reducción de *DhCTA1* en YPE-NaCl, lo que sugiere que la sal podría estar ejerciendo una regulación postranscripcional. Sorprendentemente, la expresión de *DhCTA1* es reprimida en cultivos crecidos usando glucosa como fuente de carbono si hay NaCl en el cultivo. Por su parte, en los zimogramas, la proteína *DhCtt1* sólo es evidente en cultivos crecidos en YPD hasta fase estacionaria, mientras que los análisis tipo Northern blot muestran que la expresión del gen codificado no está regulada por la fase de crecimiento, ya que es evidente la presencia del mRNA tanto en cultivos provenientes de la fase de crecimiento exponencial como de la estacionaria. Esto también sugiere, que como en el caso de *DhCTA1*, existen mecanismos postranscripcionales que jugarían un papel en la determinación del nivel de *DhCtt1*: en presencia de etanol, la expresión de *DhCTT1* está reprimida, lo que indica que la transcripción de estos genes sí es dependiente del tipo o calidad de la fuente de carbono. La presencia del cloruro de sodio en el medio de cultivo provoca una disminución aún mayor en la expresión de *DhCTT1*. Así, de

manera opuesta a lo que se ha observado en el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, la presencia del NaCl no resulta en un incremento de la actividad de catalasa en *D. hansenii*.

La sal parece estar jugando un papel protector contra el estrés oxidativo, tal como reportaron Navarrete y cols. recientemente (Navarrete y cols. 2009). Estos autores mostraron que *D. hansenii* es más sensible a agentes oxidantes como ditiotreitolo oxidado, cloruro de cadmio (CdCl_2) y H_2O_2 200mM que *S. cerevisiae*. Los tres agentes inducen la producción de EROs, y la acumulación de éstos fue siempre mayor en la levadura no convencional. Sin embargo, en presencia de sodio, mientras que la levadura de pan incrementa sus niveles de enzimas antioxidantes y crece con mayor tiempo de duplicación, *D. hansenii* supera los problemas generados por los tres factores oxidantes.

Así, lo que estoy proponiendo es que *D. hansenii* cultivada en etanol recibe un fuerte daño oxidativo y por tanto dispara una fuerte respuesta, pero en presencia de NaCl este daño no es tan alto y por ello tiene una mucho menor actividad de la enzima antioxidante.

En otros organismos se ha observado también que la actividad de catalasa puede ser regulada de manera postranscripcional. Por ejemplo, en *Hortaea werneckii*, que es una levadura negra extremadamente halotolerante (Petrovič 2006), se mostró que puede degradar una mayor cantidad de peróxido si ha sido cultivada en presencia de 17% de sal, lo que implica que tiene una mayor actividad de catalasa, sin que los autores hayan encontrado cambios a nivel de la expresión de los genes que codifican a las enzimas antioxidantes (Petrovič y cols. 2002), concluyendo que el incremento en la actividad se debería a algún mecanismo postranscripcional.

Por el contrario, el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* tiene también dos genes que codifican para catalasa, *catA* y *catB*, que se expresan bajo diferentes condiciones de estrés; sin embargo, la actividad de *CatB* está presente en todas las condiciones (Navarro y Aguirre 1998).

La catalasa mayoritaria presente en los cultivos de YPE de *Debaryomyces hansenii* cultivada hasta fase de crecimiento estacionario, fue purificada utilizando una precipitación fraccional con sulfato de amonio, una cromatografía de exclusión molecular y una cromatografía de interacción hidrofóbica, logrando así obtener la proteína pura con muy alta actividad específica. Se determinaron distintos parámetros cinéticos y la catalasa A de esta levadura comparte las mismas características que tienen otras catalasas previamente reportadas (Levy y cols. 1992, Mozaffar y cols. 1986, Fernandes y cols. 2010). La proteína purificada fue identificada mediante espectrometría de masas en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Falta mucho por hacer. A corto plazo se pretende ahondar en la capacidad que despliega *Debaryomyces hansenii* de contender, enzimática y no enzimáticamente, con diferentes agentes estresantes productores de ROS, así como determinar directamente la producción de estas especies en las distintas fuentes de carbono y con diferentes concentraciones de sal y sin ella.

En el corto plazo, se analizará el papel del glutatión como el sistema no enzimático para contender con el estrés oxidativo en esta levadura. Se cuantificará la expresión diferencial de catalasas mediante qPCR. Se complementará a una mutante acatalasémica de *Saccharomyces cerevisiae* con los dos genes que codifican a las dos catalasas de *D. hansenii* (*DhCTA1* y *DhCTT1*) y se analizará su expresión.

D. hansenii fue clasificada inicialmente como una levadura marina, debido quizá a que fue aislada por primera vez en agua de mar (Norkrans 1966), en el que el promedio de concentración de NaCl es de alrededor de 0.6 M. Sin embargo, esta levadura no convencional ha sido reconocida como contaminante común de alimentos como salchichas, quesos, salmueras y productos lácteos, y hasta de refrescos y jugos de frutas. Otras especies de levaduras que también han sido aisladas en frutas, suelos y alimentos, se pueden encontrar igual en estuarios y océanos y sin embargo, no son denominadas como marinas (Kutty y Philip 2008). *D. hansenii* también ha sido definida como un organismo inclusor de sodio (Na^+ includer organism), ya que el Na^+ no le resulta tóxico como a otras especies, e incluso se sabe que este catión es

Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*

almacenado dentro de la célula, pudiendo alcanzar concentraciones de 800 mM cuando la levadura está siendo cultivada en 1.0 M de NaCl (Prista y cols. 1997).

Hay autores que han clasificado a *Debaryomyces hansenii* como levadura halofílica, otros como halotolerante y últimamente otros la categorizan como amante de la sal. Desde mi punto de vista, la definición más adecuada es la de que *Debaryomyces hansenii* es una levadura eurihalina, capaz de adaptarse a un muy amplio rango de salinidades y que la sal le permite responder mejor a daños abióticos potenciales.

VII. PUBLICACIÓN

Can Microbiol
DOI 10.1007/s00284-010-9806-1

The Euryhaline Yeast *Debaryomyces hansenii* has Two Catalase Genes Encoding Enzymes with Differential Activity Profile

Claudia Segal-Kischinevzky · Beatriz Rodarte-Murguía ·
Victor Valdés-López · Guillermo Mendoza-Hernández ·
Alicia González · Luisa Alba-Lois

Received: 6 May 2010 / Accepted: 21 October 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract *Debaryomyces hansenii* is a spoilage yeast able to grow in a variety of ecological niches, from seawater to dairy products. Results presented in this article show that (i) *D. hansenii* has an inherent resistance to H₂O₂ which could be attributed to the fact that this yeast has a basal catalase activity which is several-fold higher than that observed in *Saccharomyces cerevisiae* under the same culture conditions, (ii) *D. hansenii* has two genes (*DhCTA1* and *DhCTT1*) encoding two catalase isozymes with a differential enzymatic activity profile which is not strictly correlated with a differential expression profile of the encoding genes.

Introduction

All aerobically growing organisms are subjected to oxidative stress which is caused by exposure to partially reduced forms of molecular oxygen, known as reactive oxygen species (ROS). These are highly reactive molecules that can damage cellular constituents such as DNA, lipids,

and proteins. Exposure to ROS is a consequence of the aerobic life; organisms have evolved mechanisms to protect their components against ROS. Oxidant defense systems have been widely studied [3, 18, 40], and it has been found that after exposure to oxidative stress cells elicit a number of inducible adaptive responses which result in protection from oxidants, such as H₂O₂, superoxide anion, and lipid peroxidation products. The oxidative stress responses appear to be regulated, at least in part, at the transcriptional level and there is a considerable overlap between those induced by oxidative stress and those provoked by other stressful conditions, allowing the cell to integrate a combined response when cells are simultaneously affected by various environmental insults [20, 43, 48]. Yeasts can proliferate in the presence of many disturbances in its growth media, and can withstand the presence of stressors in different ways. In order to cope with the ROS that are generated during respiration when O₂ is incompletely reduced and during fatty acid metabolism in the peroxisome [24, 40, 45], *Saccharomyces cerevisiae* displays an enzymatic and a non-enzymatic response. The enzymatic adaptation is carried out through the concerted action of superoxide dismutase and catalase proteins, which degrade ROS up to oxygen and water [5, 44]. It has been shown that when *S. cerevisiae* is cultured in rich media (YEP) containing ethanol as a carbon source, catalase total activity is 12-fold higher than when grown in the presence of glucose (88.1 ± 21.7 and 7.27 ± 1.69, respectively) [23].

Saccharomyces cerevisiae has two catalases. *CTA1*-encoded catalase A that is confined to peroxisomes which is involved in the degradation of the ROS generated during fatty acid degradation [52], and the *CTT*-encoded catalase T, which is a cytoplasmic enzyme, that contends with the H₂O₂ that reaches the cytoplasm [38, 42]. It has


C. Segal-Kischinevzky · B. Rodarte-Murguía ·
V. Valdés-López · L. Alba-Lois (✉)
Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional
Autónoma de México, UNAM, México, México
e-mail: lal@ciencias.unam.mx

C. Segal-Kischinevzky
e-mail: claudia.segal@gmail.com

G. Mendoza-Hernández
Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, México, México

A. González
Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de
Fisiología Celular, UNAM, México, México

Published online: 09 November 2010

 Springer

cells precultured in YPD-0.6 M NaCl were inoculated at $OD_{600nm} = 0.05$ in YPD, YPE and YPE-0.6 M NaCl. The cultures were incubated at 30°C with shaking and yeasts were grown until they reached either exponential or stationary growth phases. 15 ml of cells was treated with 300 μ l of chilled 1.0 M sodium azide (NaN_3) and gently mixed. Samples were centrifuged for 7 min at 3,000 rpm. Pellets were resuspended in 1 ml of 20 mM NaN_3 and transferred to a microcentrifuge tube, quickly spun and decanted. Cells were resuspended in 100 μ l of 20 mM NaN_3 and 200 μ l of phenol, pH 8.0, 100 μ l of ATA lysis buffer [1% SDS, 2 mM ATA, 0.5 \times LET and 0.5 mg/ μ l dithiothreitol (DTT), all in H_2O -DEPC-treated] and 0.3 μ g of acid clean and sterilized glass beads were added (5 \times LET buffer is 50 mM LiCl, 100 mM DTT in 0.5 M Tris buffer, pH 7.4). Samples were vigorously vortexed for 3 min, 200 μ l LET 1 \times added, mixed, and centrifuged for 15 min at 13,000g. RNAs were precipitated by adding absolute ethanol to the supernatant and frozen for at least 1 hour, washed with 70% ethanol with H_2O -DEPC treated and the pellet were resuspended in 1 mM ATA. RNA was separated in a 1.5% agarose, 7% formaldehyde gel, transferred to a nylon membrane, washed, and fixed. Membrane was pre-hybridized for 2 h at 65°C in 7% SDS and 0.5 M Na_2PO_4 , pH 7.2. Radiolabeled probes were prepared by random primer labeling with γ - ^{32}P -dCTP. Hybridization was performed at 65°C in 7% SDS and 0.5 M Na_2PO_4 , pH 7.2. The blot was washed twice in 2 \times SSC (1 \times SSC is 0.15 M NaCl and 0.015 M sodium citrate) containing 1% SDS for 30 min each and twice in 0.2 \times SSC and 1% SDS for 30 min each at 65°C. Filters were sequentially hybridized with the different probes for 18 h, followed by washing with 2 \times SSC containing 0.1% SDS at 65°C for 30 min. Signal was quantified using Typhoon 840 and ImageQuant TL.

Catalase Activity

Catalase activity was determined by a method adapted from Aebi [1]. Briefly, a sample (1–50 μ l) of the crude extract or purified enzyme was transferred into 3 ml quartz cuvettes and mixed with 2.9 ml assay mixture (100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 and Triton X 100 1 μ l/100 ml). The reaction was triggered by addition of 100 μ l of 500 mM hydrogen peroxide to the cuvette (final concentration of 16.6 mM), shaking vigorously. The cuvette was placed in the spectrophotometer cell holder and catalase activity was followed by A_{240nm} decay for 3 min. Catalase activity was calculated based on the rate of decomposition of hydrogen peroxide, which is proportional to the reduction of the absorbance at 240 nm. Catalase activities of the extracts were normalized to total protein in the lysate or sample and expressed as units per mg of protein. Specific activity = $u\text{ min}^{-1}/\text{mg}$ of protein,

$u\text{ min}^{-1}$ = average minute slope during 3 min reaction; ϵ = molar extinction coefficient = 0.0394 M $^{-1}$ cm [28].

Catalase activity was also determined by an alternative method measuring the initial rate of dioxygen production with a Clark microelectrode [37]. Reaction was started by injecting crude extract or a purified catalase, usually 5 μ l or less, into a sealed chamber filled with 2 ml of 10 mM H_2O_2 in 10 mM phosphate buffer, pH 7.8. Units were defined as micromoles of O_2 produced per min per mg of protein under these conditions.

Catalase Purification

Catalase was purified from 3 l of culture of *D. hansenii* grown in YPE. Cells were harvested from stationary growth phase cultures. Catalase purification was carried out using the methods described by Aebi [1] and Trindade et al. [49]. Briefly, the crude extract was subjected to ammonium sulfate (NH_4SO_4) precipitation, keeping the 40–70% saturation fraction in which activity was detected, for further purification. This fraction was dialyzed against 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 and subjected to hydrophobic interaction chromatography (HIC) on a phenyl-sepharose CL-4B column, using 1.7 M NH_4SO_4 –50 mM sodium phosphate buffer to bind catalases to the column. The column was washed using a 1.7–0 M NH_4SO_4 gradient, and then eluted with 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, followed by spectrometric measurements at A_{200nm} of the eluted samples to detect the protein as it emerges from the column. Catalase activity was determined in selected samples. Fractions with activity were pooled and concentrated by polyethylene glycol to ~ 0.2 mg/ml of protein and kept at 4°C until further use.

Electrophoresis and Stain Activity

Non-denaturing or SDS polyacrylamide gel electrophoresis was performed on 7.5% slab gels, running slowly at 12 V for 24 h. Proteins in polyacrylamide gels were visualized with Coomassie blue. To stain for catalase activity, the non-denaturing gel was rinsed twice with tap water, incubated in 100 mM H_2O_2 solution for 10 min, rinsed again with tap water and soaked in 1:1 iron (III) chloride: potassium ferricyanide solution until the gel was stained. Blue color developed in the gel except at zones where H_2O_2 was decomposed by catalase [50].

Kinetic Determinations and Effect of Inhibitors

To measure the catalytic parameters of the enzyme, 1 μ g of pure one was mixed with 2.9 ml of 50 mM phosphate buffer; the reaction was triggered by the addition of different H_2O_2 concentrations (0–100 mM) [33]. Catalase

activity was determined spectrophotometrically measuring the rate of hydrogen peroxide degradation at 240 nm. The initial linear rate was used to calculate the specific activity.

Optimum pH was determined in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 4.0–8.5). Kinetic constants, including V_{max} and K_M apparent values, were determined by Lineweaver–Burk and Eadie Hofstee plot graphs.

The inhibitory effects of various concentrations of NaCl, 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) [14, 25], NaN_3 , and ethanol [17, 35] on catalase activity at constant enzyme concentrations, were estimated at pH 7.0, using a H_2O_2 fixed concentration as a substrate. The enzyme was incubated for 5 min in the presence of the inhibitor, the reaction was triggered by the addition of 16.6 mM H_2O_2 , and followed spectrophotometrically.

Protein Determinations

Protein was quantified using the Quick Start Bradford Protein Assay from Bio-RAD, which is based on the absorbance at 595 nm of the complex between Coomassie Brilliant Blue G-250 and protein. Bovine serum albumin was used as standard.

Tandem Mass Spectrometry (LC/Esi-MS/MS)

The protein band obtained after the purification was excised from Coomassie stained SDS gel, destained, reduced, carbamidomethylated, washed, digested with modified porcine trypsin, and extracted as previously described [51]. Peptide mass spectrometric analysis was carried out using a 3,200 Q TRAP hybrid tandem mass spectrometer, equipped with a nanoelectrospray ion source (NanoSpray II) and a MicroIonSpray II head. The instrument was coupled on line to a nanoAcquity Ultra Performance LC system. Spectra were acquired in automated mode using Information Dependent Acquisition (IDA). Precursor ions were selected in Q1 using the enhanced MS mode (EMS) μs survey scans. The EMS was followed by an enhanced resolution scan (ER) of the three most intense ions at the low speed of 250 amu/sec, to determine the ion charge state, and then by an enhanced product ion scan (EPI). Precursor ions were fragmented by collision-activated dissociation (CAD) in the Q2 collision cell. The fragment ions generated were captured and mass analyzed in the Q3 linear ion trap.

Protein identification was performed by searching MS/MS spectra datasets using MASCOT (version 1.6b9, available at <http://www.matrixscience.com>). Mass tolerances of 0.5 and 0.3 Da were used for precursor and fragment ion masses, respectively. Carbamidomethyl-cysteine was the fixed modification and one missed cleavage

for trypsin was allowed. Search was conducted using the *Fungi* subset of the NCBItr database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Results

D. hansenii Displays a Higher H_2O_2 Tolerance than *S. cerevisiae*

Debaryomyces hansenii has been described as a halotolerant yeast [7, 12, 39]. However, we have found that the Y7426 *D. hansenii* strain is able to sustain a similar growth rate in either rich ($\mu = 0.231 \text{ h}^{-1}$) or minimal ($\mu = 0.154 \text{ h}^{-1}$) growth media with or without 1.0 M NaCl [2], in agreement with previous observations, which classify *D. hansenii* as an euryhaline yeast [11, 46]. This characteristic has allowed us to analyze certain aspects of the NaCl response of this yeast using salt concentrations, which do not affect growth rate, ruling out the possibility that the observed response could be due to an effect of growth rate variation. As Fig. 1 shows *S. cerevisiae* growth pattern is similar on either YPD or YPD plus 0.6 M NaCl, reaching the stationary phase after 30 h of incubation. *D. hansenii* shows a higher duplication rate as compared to that of *S. cerevisiae* but a similar growth kinetics on YPD and YPE in the presence and absence of 0.6 M NaCl, reaching stationary phase after 50 h.

It has been shown that in *S. cerevisiae*, catalase activity is increased by NaCl induced stress and that *D. hansenii* displays high superoxide dismutase activity under these conditions [15]. It could be thus considered that high H_2O_2 production through SOD activity could exert a positive effect on catalase activity or on the expression of the encoding gene(s). To analyze this matter, we determined catalase activity in cultures of *S. cerevisiae* and *D. hansenii* grown on rich YPD media without salt or in the presence of 0.6 M NaCl. Extracts obtained from *S. cerevisiae* cultures grown in the presence of salt, displayed a fivefold increased catalase activity as compared to that obtained in extracts from NaCl-free culture conditions (0.03 ± 0.009 versus $0.152 (\pm 0.021)$). In extracts prepared from *D. hansenii* cultures, catalase activity displayed nearly a two-fold increase when it was determined from salt-grown cultures as compared to that found in the absence of salt (Table 1). In addition, *D. hansenii* extracts, obtained from YPD cultures, showed 24-fold higher catalase activity than those obtained from *S. cerevisiae* (0.03 ± 0.009 vs. 0.73 ± 0.16); accordingly, *D. hansenii* extracts obtained from cells grown on YPD–NaCl showed eightfold higher activity than those of *S. cerevisiae* grown on same media (0.152 ± 0.021 vs. 1.24 ± 0.02). It could be thus considered that the higher basal level of catalase

Fig. 1 Growth curve of *S. cerevisiae* and *D. hansenii* grown on YPD and YPD plus 0.6 M NaCl during 96 h. Also, the growth curve of *D. hansenii* shows YPE and YPE plus 0.6 M NaCl culture media

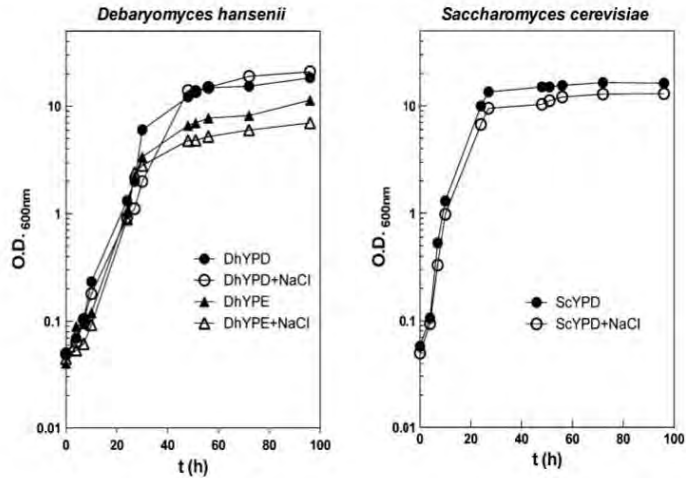


Table 1 Total catalase specific activity (moles of H₂O₂ oxidized/min/mg of protein) of *D. hansenii* grown until exponential and stationary phases in rich media using two carbon sources and in the absence or presence of 0.6 M NaCl

<i>D. hansenii</i> catalase specific activity growing until exponential and stationary phases, in YPD and YPE with or without salt				
Culture	Glucose (YPD)		Ethanol (YPE)	
0.6 M NaCl	-	+	-	+
Exponential	0.73 (±0.16)	1.24 (±0.2)	3.8 (±0.22)	3.6 (±0.36)
Stationary	1.5 (±0.23)	0.4 (±0.18)	10.5 (±1.03)	2.0 (±0.47)

Catalase activity was highest in alcoholic carbon source when yeast was grown until exponential and stationary phases, compared when it was grown in glucose. Interestingly, when *D. hansenii* was grown in the presence of 0.6 M NaCl, the catalase activity rather decreases in the stationary growth phase, in opposition to the *S. cerevisiae* response to the NaCl stress. Values are presented as means (±SD) from at least ten independent experiments

activity shown by *D. hansenii* extracts obtained from YPD grown yeasts could result in a higher inherent resistance to oxidative stress as compared to that displayed by *S. cerevisiae*. To analyze this matter oxidative shock tolerance was assayed. Both yeast species were treated with H₂O₂ increasing concentrations during exponential and stationary growth phases. The results of this cell viability assay showed that under exponential growth phase, *D. hansenii* is able to grow in the presence of H₂O₂ concentrations, which inhibit *S. cerevisiae* growth, Fig. 2. When yeasts were grown in the presence of 0.6 M NaCl and H₂O₂, resistant phenotype was evident in *D. hansenii*; conversely, *S. cerevisiae* growth was severely impaired in the presence of both stressors. When cells were collected from stationary growth phase, both yeasts improved their resistance to H₂O₂ treatment (Fig. 2).

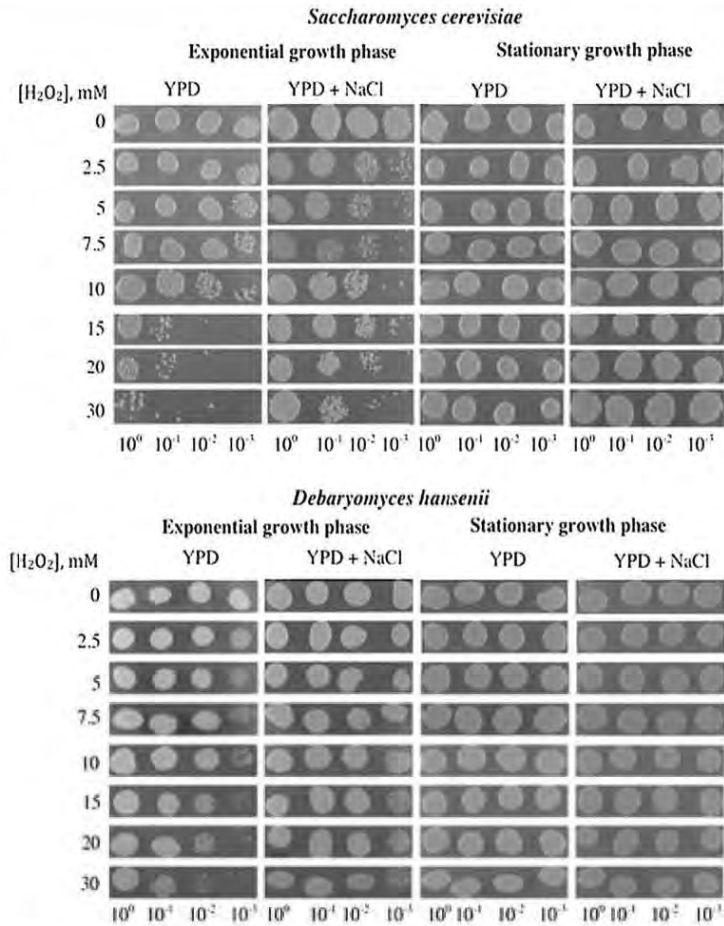
Above presented results indicate that *D. hansenii* displays an inherently high catalase activity in either YPD or YPD-0.6 M NaCl that results in a higher H₂O₂ tolerance as

compared to that displayed by *S. cerevisiae*. To further analyze the role of catalase in stress resistance, sequence genome comparison was carried out with *S. cerevisiae* to search the corresponding orthologous gene(s).

D. hansenii has Two Genes Encoding Catalase Isozymes

Saccharomyces cerevisiae has a *CTA1*-encoded peroxisomal catalase and a *CTT1*-encoded cytoplasmic catalase. To analyze whether *D. hansenii* had *CTA1* and *CTT1* orthologous counterparts, a computer-based analysis of the Genolevures database (available at <http://www.genolevures.org>) was performed [41], using *D. hansenii* genomic sequence. This analysis revealed that this yeast harbored two ORFs that could presumably encode for two catalase isoforms with approximate molecular weights of 54.9 and 63.1 kDa, respectively. The *DhCTA1* presumed orthologous ORF was identified to be DEHA2F10582 g

Fig. 2 *S. cerevisiae* and *D. hansenii* resistance to H₂O₂ stress, after grown with and without salt (0.6 M NaCl). Exponential and stationary growth phase cultures of *S. cerevisiae* and *D. hansenii* were diluted with fresh media (YPD) and exposed to 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15, 20, and 30 mM H₂O₂ for 3 h. After the treatment, H₂O₂ was removed by centrifugation. The cultures were resuspended in distilled water, serially diluted, and each dilution was spotted onto YPD plates, ensuring that the same amounts of cells were plated. Plates were incubated at 30°C for 3–5 days



located in F chromosome, while *DhCTT1* counterpart was found to correspond to DEHA2B16214 g located in B chromosome. Accordingly, a zymogram performed on an electrophoresed crude extract of *D. hansenii*, obtained from YPD grown cultures after different incubation periods, showed two bands displaying catalase activity (Fig. 3a). Worth of mention is the fact that the low molecular weight activity (*DhCtt1*) only appeared after 24 h of incubation and was not observed in stationary phase NaCl-treated cultures, Fig. 3a and b. Only the *DhCta1* band was observed when yeasts were incubated to exponential or stationary phases in the presence of 0.6 M NaCl (Fig. 3b). Extracts from YPE-grown cells were analyzed, and only

the high molecular form (*DhCta1*) was observed under exponential and stationary growth phases (Fig. 3b).

D. hansenii *CTA1*-Encoded Catalase Activity is Positively Modulated by Growth Phase and Non-Fermentable Carbon Sources

It has been previously reported, that when *S. cerevisiae* is grown in 2% ethanol as carbon source, the activity of the primary antioxidant enzymes (SOD and catalase) as well as the levels of carbonyl-proteins and TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances), which accumulate as a result of oxidative damage to proteins and lipids, are increased with

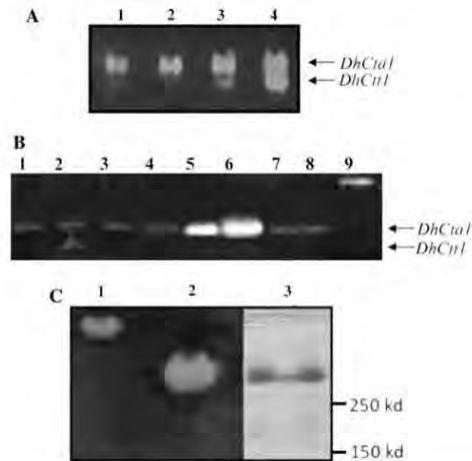


Fig. 3 a Zymogram from *D. hansenii* grown in rich media containing glucose as carbon source; samples were taken at different times: Lane 1, 6 h; lane 2, 12 h; lane 3, 24 h; lane 4, 48 h. b Zymogram from *D. hansenii* grown until exponential and stationary phases in YPD and YPE in the presence or absence of 0.6 M NaCl. Lane 1, YPD exponential (exp); lane 2, YPD stationary (sta); lane 3, YPD-NaCl exp; lane 4, YPD-NaCl sta; lane 5, YPE exp; lane 6, YPE sta; lane 7, YPE-NaCl exp; lane 8 YPE-NaCl sta; lane 9, human erythrocyte catalase. c Zymogram of the purified catalase from *D. hansenii*: Lane 1, human erythrocyte catalase; lane 2, 0.1 µg of purified *D. hansenii* catalase; lane 3, Coomassie's stain PAGE 10 µg of purified *D. hansenii* catalase

respect to glucose containing media [24]. To analyze whether *D. hansenii* showed a similar response when grown in the presence of 2% ethanol, *D. hansenii* catalase activity was determined during exponential and stationary phases on YPD (glucose) and YPE (ethanol) growth medium. Catalase activity determined as described by Aebi [1], on extracts prepared from cultures grown on YPD, showed a twofold increased activity in stationary growth phase as compared to those prepared from exponential growth cultures, which could be afforded by the combined action of *DhCta1* and *DhCtt1*, since both activities are evident under stationary phase (Fig. 3a and b, Table 1). *DhCtt1* zymogram-determined activity was not observed in extracts obtained from stationary growth-phase cultures carried out in the presence of NaCl, thus indicating that in the presence of salt activity could only be provided by *DhCta1*. These results also indicate that *DhCtt1* could have a differential expression pattern that may result in expression repression under exponential growth phase and in the presence of NaCl. In addition, it was found that catalase activity determined in extracts prepared from either exponential or stationary YPE cultures, showed a

four to sevenfold increase as compared to activity determined in equivalent extracts prepared from YPD cultures, which was not observed when yeast was grown on YPE in the presence of 0.6 M NaCl. These results indicate that *DhCta1*-dependent catalase activity is positively regulated under stationary phase, this effect is enhanced in the presence of ethanol as sole carbon source; these positive effects are hindered in the presence of 0.6 M NaCl.

D. hansenii Catalase-Encoding Paralogues are Differentially Regulated by the Carbon Source

In order to analyze whether increased catalase activity in the presence of ethanol corresponded to increased expression level, Northern blot analysis was performed with total RNA obtained from *D. hansenii* grown in YPD, YPD-0.6 M NaCl; YPE and YPE-0.6 M NaCl, and samples were taken from exponential and stationary growth phases. Results show that *DhCta1* and *DhCtt1* are differentially expressed. *DhCta1* expression levels are slightly higher under respiratory conditions as compared to those found on glucose, in agreement with the results obtained in the zymogram analysis. In addition, *DhCta1* expression was repressed when the yeast was grown in glucose and NaCl, this effect was not observed in RNA samples obtained from ethanol grown cells. These results indicate that *DhCta1* is transcriptionally regulated by the carbon source and by NaCl. Conversely, *DhCtt1* expression was highest under fermentative conditions and repressed when the yeast was grown on non-fermentable substrates like ethanol. In the presence of 0.6 M NaCl, ethanol-dependent expression was repressed (Fig. 4). These will be further discussed.

Catalase Purification from Ethanol-Growing Cells and Identification of the Peroxisomal Catalase (*DhCta1*) by Tandem Mass Spectrometry

Considering that on stationary phase ethanol grown cultures a large single catalase band was observed, we purified this isoform through ammonium sulfate precipitation followed by a chromatographic HIC column. A single band was obtained as seen on SDS/PAGE (Fig. 3c). The purified protein was analyzed by MS/MS spectrometry. It was found that the protein corresponded to a presumed peroxisomal catalase (gi|50424473), *DhCta1* present in *D. hansenii*. The global score was 1,182 with 26 matching peptides that covered 63% of the sequence. The protein had a nominal mass of 54,836 Da with a calculated *pI* of 6.47 (Fig. 5). Thus it can be presumed that the peroxisomal catalase (*DhCta1*) is involved in hydrogen peroxide detoxification generated during the oxidative stress induced by ethanol in *D. hansenii*.

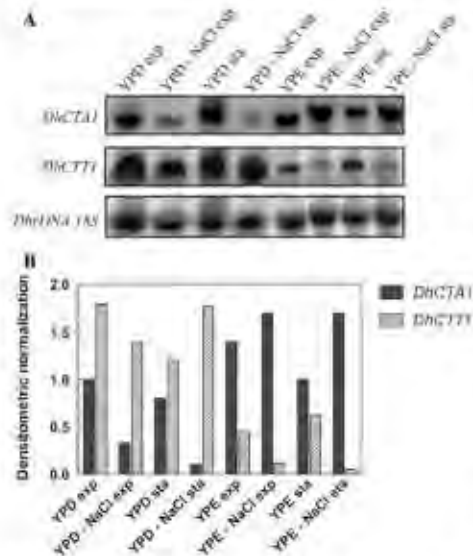


Fig. 4 Northern blot of *D. hansenii* RNA from cells grown on either YPD or YPE and in the presence or absence of salt. Total RNA was isolated from exponential (exp) and stationary (sta) growth phase cultures. **a** Northern blot using *DhCTA1*, *DhCTT1*, and *Dh18S rDNA* as a probe. The latter was used as internal control. Three sets of deoxyoligonucleotides were used to PCR-amplify three fragments of 2,007 bp, 3,174 and 1,800 bp; these were used as probes for sequential hybridization of *DhCTA1*, *DhCTT1*, and *Dh18S rDNA*. **b** Normalized expression levels of *DhCTA1* and *DhCTT1* using data obtained from the Northern blot

Kinetic analysis of the purified enzyme preparation under various H_2O_2 concentrations, using the Lineweaver-Burk and Eadie Hofstee plotting methods allowed to get the apparent K_M and V_{max} values which average of 44 mM and 106 nmol/min/mg of protein, respectively, Fig. 5.

The effect of ionic strength on the activity of the purified catalase was also tested with NaCl, showing virtually no inhibition at any NaCl concentration assessed (0.1–1,000 mM). In addition, we examined the effect of some catalase inhibitors, including NaN₃, which is a very potent inhibitor that binds irreversibly to the heme cofactor [17]. This inhibitor impaired catalase activity at a concentration as low as 0.5 μ M, and reached 80% enzyme inhibition at a concentration lower than 0.2 mM. Conversely, the specific catalase inhibitor 3AT [14] showed no effect even at a 5 mM concentration. The effect of pH was also assayed. As expected, a bell-shaped curve for catalase activity was obtained for the pure *DhCTA1* preparation. The optimum pH for this purified catalase was 7.0 (data not shown).

Springer

Discussion

When the yeast *S. cerevisiae* is grown in rich media in the presence of 2% ethanol, it exhibits a strong activation of antioxidant enzymes as compared to those found on rich media containing glucose [23]. This article reports that, as opposed to what has been found for *S. cerevisiae*, *D. hansenii* shows a strong catalase activity in rich media containing glucose, which increases significantly when the yeast is grown in non-fermentable carbon sources like ethanol. Catalase activity is further augmented in ethanol cultures during stationary growth phase. However, the positive effect exerted through ethanol and stationary phase is not observed in the presence of NaCl, suggesting that under this condition, oxidative stress could be dampened thus diminishing the stress response that triggers catalase increase. This could also be considered as a NaCl protective role, which has also been observed for other xenobiotic injuries [10, 30, 34].

Saccharomyces cerevisiae has two genes *CTT1* and *CTA1* that encode two proteins with catalase enzymatic activity. Encoded enzymes have been studied in detail [38, 42, 52]. By gene sequence comparison, we identified two putative ORFs in the *D. hansenii* genome, DEHA2B16214 g and DEHA2F10582 g, respectively, localized in the B and F chromosomes. In addition, we identified two proteins of different size with catalase activity, using PAGE and dye analyses. When we evaluated the specific activity using spectrophotometrical and oxymetrical methods, we found a higher level of catalase activity in this euryhaline yeast as compared to that detected in *S. cerevisiae* (Table 1). Zymogram analysis revealed *DhCta1* activity is increased when *D. hansenii* is grown on YPE; the effect is enhanced during stationary phase and hindered in the presence of NaCl. Increased activity corresponded to increased *DhCTA1* specific mRNA; however, the negative effect exerted by NaCl was not correlated with reduced expression on YPE-NaCl, suggesting post transcriptional regulation. In spite of this, in glucose grown cultures *DhCTA1* expression was repressed in the presence of NaCl. In regard to *DhCtt1*, although zymogram analysis indicated that this enzyme is only evident in stationary phase, expression analysis indicated that the encoding gene is not regulated by growth phase since similar *DhCTT1* mRNA levels were detected under exponential or stationary phase. These results indicate that as well as for *DhCTA1*, posttranscriptional mechanisms could play a key role determining *DhCta1* levels. In the presence of ethanol, *DhCTT1* expression was repressed suggesting that this gene expression could be regulated by the nature or quality of the carbon source. The presence of NaCl in the growth media further decreased *DhCTT1* expression. Therefore, as opposed to what has been observed in *Saccharomyces*, NaCl does not trigger the mechanism that

Fig. 5 The purified protein was found to correspond to peroxisomal catalase of *D. hansenii* (gi150424473). The global score was 1,182 with 26 matching peptides that covered 63% of sequence. The protein had a nominal mass of 54,836 Da and a calculated *pI* of 6.47

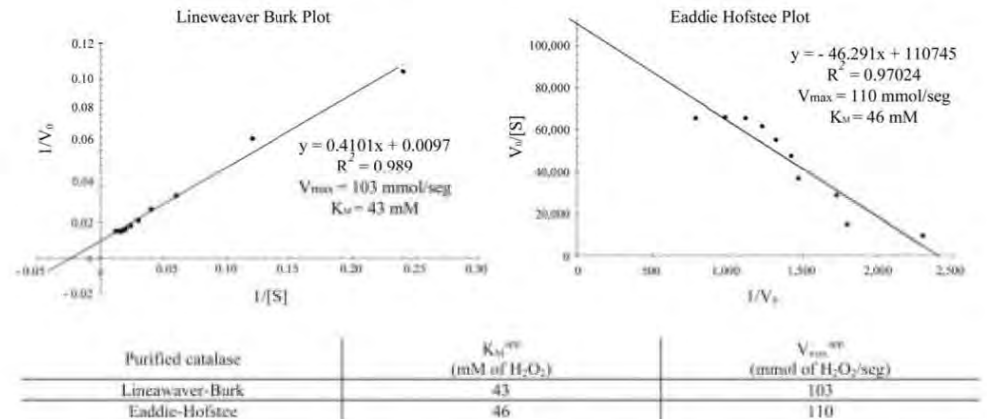


Fig. 6 Kinetics parameters of catalase purified from YPE of *D. hansenii*. The apparent K_M and V_{max} of catalase were calculated using two methods

results in increased catalase activity in *D. hansenii*. NaCl could have a protective role against oxidative stress in *D. hansenii*, as has been reported recently by Navarrete et al. [26]. We thus propose that *D. hansenii* growing in ethanol and salt is refractory to oxidative stress and consequently does not trigger a stress responsive reaction.

Catalase post transcriptional regulation has been observed in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* [31]. Author showed increased hydrogen peroxide degradation, indicating increased catalase activity when this yeast was grown in 17% NaCl, however, no change in oxidative responsive genes expression was

observed [32], thus it was concluded that increased activity could be due to a post transcriptional mechanism. Conversely, in *Aspergillus nidulans* the two catalase-encoding genes, *catA* and *catB* were transcribed under different stress conditions although only *CatB* activity was present in all conditions [27].

Debaryomyces hansenii has been classified as marine yeast, mainly due to the fact that it was isolated from marine water [29], where the average NaCl content is around 0.6 M. However, this non-conventional yeast has been largely recognized as a common contaminant of sausages, chesses, brines, and dairy products, and even soft

drinks and fruit syrups [36]. Other yeast species also found in fruits, soil and food, are most likely not native to estuaries and seas, even if they are very frequently isolated from such areas [21]. *D. hansenii* has been defined as a Na⁺ includer organism, since some reports have shown that sodium is not toxic to this yeast and it can even be stored inside the cell [34]. Some authors have classified *D. hansenii* as a halotolerant yeast, others as a halophilic one, and more recently as a salt loving yeast [36]. We think that a more suitable classification may be euryhaline yeast [11, 46], because it can adapt to a wide range of salinities as described above.

Acknowledgments The authors are deeply indebted with the advices of René Cárdenas throughout the work, of Facultad de Ciencias, UNAM and to the technical assistance of Cristina Aranda and Pablo Rangel, from Instituto de Fisiología Celular, and Alfonso Vilchis of Facultad de Ciencias, UNAM. We are grateful to L. Ongay and M. Mora (Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM) for the synthesis of deoxyoligonucleotides. Claudia Segal-Kischinevsky is grateful to the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, for the support during PhD studies. This work was supported partially by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (IN241602).

References

- Aebi H (1984) Catalase in vitro, *Methods Enzymol* 105:121–126
- Alba-Louis L, Segal C, Rodarte B et al (2004) NADP⁺ glutamate dehydrogenase activity is increased under hyperosmotic conditions in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Curr Microbiol* 48:68–72
- Aguirre J, Ríos-Momberg M, Hewitt D, Hansberg W (2005) Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol* 13:111–118
- Bansal PK, Mondal AK (2000) Isolation and sequence of the *HOG1* homologue from *Debaryomyces hansenii* by complementation of the *hog1* strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16:81–88
- Bartosz G (2005) Superoxide dismutases and catalase. In: *The handbook of environmental chemistry*, vol 2, Part O. Springer, Heidelberg, pp 109–149
- Beers RF, Sizer IW (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195:133–140
- Breuer U, Harms H (2006) *Debaryomyces hansenii*—an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* 23:415–437
- Cuellar-Cruz M, Briones-Martin-del-Campo M, Cañas-Villamar I et al (2008) High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, *Cta1p*, and is controlled by the transcription factors *Yap1p*, *Skn7p*, *Msn2p*, and *Msn4p*. *Eukaryot Cell* 7:814–825
- Fernandes R, Melo A, Flávia K et al (2010) Purification of *Paracoccidioides brasiliensis* catalase P: subsequent kinetic and stability studies. *J Biochem* 147:345–351
- Gori K, Hébraud M, Chambon C et al (2007) Proteomic changes in *Debaryomyces hansenii* upon exposure to NaCl stress. *FEMS Yeast Res* 7:293–303
- Govind NS, McNally KL, Trench RK (1992) Isolation and sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene from the euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii*. *Curr Genet* 22:191–195
- Guerrero C, Aranda C, DeLuna A et al (2005) Salt-dependent expression of ammonium assimilation genes in the halotolerant yeast, *Debaryomyces hansenii*. *Curr Genet* 47:163–171
- Hallick RB, Chelm BK, Gray WP, Orozco EM (1977) Use of aurintricarboxylic acid as an inhibitor of nucleases during nucleic acid isolation. *Nucleic Acids Res* 4:3055–3064
- Havir EA (2003) The in vivo and in vitro inhibition of catalase from leaves of *Nicotiana sylvestris* by 3-amino-1,2,4-triazole. *J App Microbiol* 95:364–371
- Hernández-Saavedra Y, Ochoa JI (1999) Copper–zinc superoxide dismutase from the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* 15:657–668
- Izawa S, Inoue Y, Kimura A (1996) Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 320:61–67
- Johnston MA, Delwiche EA (1965) Isolation and characterization of the cyanide-resistant and azide-resistant catalase of *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* 90:352–356
- Jones DP (2008) Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol* 295:C849–C868
- Koleva DI, Petrova VY, Kujumdzieva V (2008) Comparison of enzymatic antioxidant defense systems in different metabolic types of yeasts. *Can J Microbiol* 54:957–963
- Krawiec Z, Bilinski T, Schüller C, Ruis H (2000) Reactive oxygen species as second messengers? Induction of the expression of yeast catalase T gene by heat and hyperosmotic stress does not require oxygen. *Acta Biochim Pol* 47:201–207
- Kuivy SN, Philip R (2008) Marine yeast—a review. *Yeast* 25:465–483
- Levy E, Fyal Z, Hochman A (1992) Purification and characterization of a catalase-peroxidase from the fungus *Septoria tritici*. *Arch Biochem Biophys* 296:321–327
- Lushchak VI, Gospodaryov DV (2005) Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol Intern* 29:187–192
- Lushchak VI (2006) Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. *Acta Biochim Pol* 53:679–684
- Mozaffar S, Ueda M, Kitatsuji K et al (1986) Properties of catalase purified from a methanol-grown yeast, *Kloeckera sp.* 2201. *Eur J Biochem* 155:527–531
- Navarrete C, Siles A, Martínez JL et al (2009) Oxidative stress sensitivity in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* 9:582–590
- Navarro RE, Aguirre J (1998) Posttranscriptional control mediates cell type-specific localization of catalase A during *Aspergillus nidulans* development. *J Bact* 180:5733–5738
- Nelson DP, Kiesow LA (1972) Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem* 49:474–478
- Norkrans B (1966) Studies on marine occurring yeasts: growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Arch Mikrobiol* 54:374–392
- Papouska K, Sychrova H (2007) The co-action of osmotic and high temperature stresses results in a growth improvement of *Debaryomyces hansenii* cells. *Int J Food Microbiol* 118:1–7
- Petrovič U (2006) Role of oxidative stress in the extremely salt-tolerant yeast *Hortaea werneckii*. *FEMS Yeast Res* 6:816–822
- Petrovič U, Gunde-Cimerman N, Plemenitaš A (2002) Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Mol Microbiol* 45:665–672
- Price VE, Recheigl M, Hartley RW (1961) Methods for determining the rates of catalase synthesis and destruction in vivo. *Nature* 189:62–63

34. Prista C, Almagro A, Loureiro-Diez MC, Ramos J (1997) Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl Environ Microbiol* 63:4005–4009
35. Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA (2000) Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol* 296:295–309
36. Ramos J (2005) Introducing *Debaryomyces hansenii*, a salt loving yeast. In: Gunde-Cimerman N, Oren A, Plemenitaš A (eds) *Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Springer, Netherlands, pp 441–451
37. Rørth M, Jensen PK (1976) Determination of catalase activity by means of the Clark oxygen electrode. *Biochim Biophys Acta* 139:171–173
38. Ruis H, Köller F (1997) Biochemistry, molecular and cell biology of yeast and fungal catalases. In: Scandalios JG (ed) *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defences*. Cold Spring Harbor, New York, pp 309–342
39. Sánchez NS, Arreguín R, Calahorra M, Peña A (2008) Effects of salts on aerobic metabolism of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* 8:1303–1312
40. Scandalios JG (2002) The rise of ROS. *Trends Biochem Sci* 27:483–486
41. Sherman DJ, Martin T, Nikolski M, et al. Génolevures Consortium (2009) Génolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes. *Nucl Acid Res* 37, Database issue: D550–D554
42. Schuller C, Brewster JL, Alexander MR et al (1994) The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene. *EMBO J* 13:4382–4389
43. Steels EL, Learmonth RP, Watson K (1994) Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiol* 140:576–596
44. Switala J, Loewen PC (2002) Diversity of properties among catalases. *Arch Biochem Biophys* 401:145–154
45. Tanghe A, Prior B, Thevelein JM (2006) Yeast responses to stress. In: Rosa CA, Peter G (eds) *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer, Berlin, pp 175–195
46. Thome PE, Trench RK (1999) Osmoregulation and the genetic induction of glycerol-3-phosphate dehydrogenase by NaCl in the euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii*. *Mar Biotechnol* 1: 230–238
47. Thome-Ortiz PE, Peña A, Ramirez J (1998) Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentrations of KCl and NaCl. *Yeast* 14: 1355–1371
48. Toledano M, Delaunay A, Biteau B et al (2003) Oxidative stress responses in yeast. In: Hohmann S, Mager WH (eds) *Topics current genetics*, vol 1. Springer, Berlin, pp 241–303
49. Trindade H, Karmali A, Pais MS (1988) One-step purification and properties of catalase from leaves of *Zantedeschia aetgiopica*. *Biochimie* 70:1759–1763
50. Woodbury W, Spencer AK, Stahman MA (1971) An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal Biochem* 44:301–305
51. Xolalpa W, Vallecillo AJ, Lara M et al (2007) Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics* 7:3332–3341
52. Zimniak P, Hartter E, Woloszczuk W, Ruis H (1976) Catalase biosynthesis in yeast: formation of catalase A and catalase T during oxygen adaptation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 71:393–398

VIII. REFERENCIAS

- Aebi H (1984) Catalase *in Vitro*. *Methods Enzymol* 105: 121–126
- Agarwal S, Sharma S, Agrawal V, Roy N (2005) Caloric restriction augments ROS defense in *S. cerevisiae*, by a Sir2p independent mechanism. *Free Radic Res* 39: 55-62
- Aguilera J, Rande-Gil F, Prieto JA (2007) Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: new functions for old mechanisms. *FEMS Microbiol Rev* 31: 327–341
- Aguirre J, Ríos-Momberg M, Hewitt D, Hansberg W (2005) Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol* 13: 111–118
- Alba-Lois L, Segal C, Rodarte B, Valdés-López V, DeLuna A, Cárdenas R (2004) NADP-glutamate dehydrogenase activity is increased under hyperosmotic conditions in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Curr Microbiol* 48: 68-72
- Avery AM, Avery SV (2001) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J Biol Chem* 276: 33730 – 33735
- Avery AM, Willetts SA, Avery SV (2004) Genetic dissection of the phospholipid hydroperoxidase activity of yeast Gpx3 reveals its functional importance. *J Biol Chem* 279: 46652 - 46658
- Baeuerle, PA (1991). The inducible transcription activator NF-κB: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta* 1072: 63-80
- Bansal PK, Mondal AK (2000) Isolation and sequence of the HOG1 homologue from *Debaryomyces hansenii* by complementation of the hog1 strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16: 81–88
- Bartosz G (2005) Superoxide dismutases and catalase. *In: The handbook of environmental chemistry*, vol 2, Part O. Springer, Heidelberg, pp 109–149
- Beers RF, Sizer IW (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195: 133–140
- Bhota A (2006) Yeasts in soil. *In: The yeast handbook*, biodiversity and ecophysiology of yeasts: 221-240
- Bjørn Sørensen B (1996) Lipolysis of pork fat by the meat starter culture *Debaryomyces hansenii* at various environmental conditions. *Int J Food Microbiol* 34: 187-193
- Bolwell GP, Wojtaszek P (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defences. *Physiol Plant Pathol* 51: 347-366

Boveris, A (2005) La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Ars Pharm* 46: 85-95

Boveris A, Costa LE, Cadenas E, Poderoso JJ (1999) Regulation of mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen and nitric oxide. *Meth Enzymol* 301: 188-198

Braga FM, Panek AD, Araujo EC (2005) The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell stress chaper* 10: 167-170

Breuer U, Harms H (2006) *Debaryomyces hansenii*—an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* 23:415–437

Cabrera-Orefice A, Guerrero-Castillo S, Luevano-Martinez LA, Pena A, Uribe-Carvajal S (2010) Mitochondria from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* (halophilic organelles?) *J Bioenerg Biomembr* 42: 11-19

Caridi A, Pulvirenti A, Restuccia C, Sidari R (2005) Screening for yeasts able to hydrolyse arbutin in the presence of glucose or etanol. *Ann Microbiol* 55: 43-46

Chelstowska A, Butow RA (1995) RTG genes in yeast that function in communication between mitochondria and the nucleus are also required for expression of genes encoding peroxisomal proteins. *J Biol Chem* 270: 18141-18146

Carlson M, Botstein D (1982) Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell* 28: 145-154

Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159

Clarke L (1990) Centromeres of budding and fission yeasts. *Trends Genet* 6: 150-154

Cohen G, Fessl F, Traczyk A, Rytka J, Ruis H (1985). Isolation of the catalase A gene of *Saccharomyces cerevisiae* by complementation of the cta1 mutation. *Mol Gen Genet* 200: 74-79

Cong YS, Yarrow D, Li YY, Fukuhara H (1994) Linear DNA plasmids from *Pichia etchellsii*, *Debaryomyces hansenii* and *Wingea robertsiae*. *Microbiol* 140: 1327-1335

Converti A, Domínguez JM (2001). Influence of temperature and pH on xylitol production from xylose by *Debaryomyces hansenii*. *Biotechnol Bioeng* 75: 39-45

Cross HS, Ruis H (1978) Regulation of catalase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by carbon catabolite repression. *Mol Gen Genet* 166: 37-43

Cuéllar-Cruz M, Briones-Martin-del-Campo, M, Cañas-Villamar I, Montalvo-Arredondo J, Riego-Ruiz L, Castaño I, De Las Peñas A (2008) High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single

catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot Cell* 7: 814-825

Davidson JF, Whyte B, Bissinger PH, Schiestl RH (1996) Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* 93: 5116-5121

Davies KJ (1995) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 61: 1-31

Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledano MB (2002) A thiol peroxidase in as H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111: 471-481

DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278: 680-686

Domínguez JM (1998) Xylitol production by free and immobilized *Debaryomyces hansenii*. *Biotech Lett* 20: 53-56

Domínguez L, Sosa-Peinado A, Hansberg W (2010) Catalase evolved to concentrate H₂O₂ at its active site. *Arch Biochem Biophys* 500: 82-91

Du X, Takagi H (2007) N-Acetyltransferase Mpr1 confers ethanol tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. *Appl Microbiol Biotechnol* 75: 1343-1351

Dujon B, Consortium GS (2003) Comparative genomics of hemiascomycetous yeasts: the systematic sequencing of *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 20: S15-S15

Fabrizio P, Battistella L, Vardavas R, Gattazzo C, Liou L-L, Diaspro A, Dossen JW, Gralla EB, Longo VD (2004) Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 166:1055-1067

Fernandes R, Melo A, Flávia K, Winters MS, Pereira M, Almeida CM (2010) Purification of *Paracoccidioides brasiliensis* catalase P: subsequent kinetic and stability studies. *J Biochem* 147: 345-351

Fernández-González M, DiStefano R, Briones A (2003) Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species. *Food Microbiol* 20: 35-41

Fia G, Giovani G, Rosi I (2005) Study of β -glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. *J Appl Microbiol* 99: 509-517

Fleet GH (1990) Yeasts in dairy products - a review. *J Appl Bacteriol* 68: 199-211

- Fleet GH, Heard GM (1993) Yeast-growth during fermentation. In: Fleet H (ed) *Wine Microbiology and Biotechnology*. Switzerland: Hardwood Academic Publishers, pp 27–57
- Folch-Malloi JL, Garay-Arroyo A, Lledías F, Covarrubias-Robles A (2004) La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev Lat Microbiol* 46: 24-46
- Freeman BA, Crapo JD (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426
- Gaad GM, Edwards SW (1986) Heavy-metal induced flavin production by *Debaryomyces hansenii* and posible connections with ion metabolism. *Br Myco Soc* 87: 533-542
- García-González A, Ochoa JL (1999) Anti-inflammatory activity of *Debaryomyces hansenii* Cu,Zn-SOD. *Arch Med Res* 30: 69–73
- Gash AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Store G, Botstein D, Brown PO (2000) Genomic expression programs in the reponse of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11: 4241-4257
- Giannattasio S, Guaragnella N, Corte-Real M, Passarella S, Marra E (2005) Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death. *Gene* 354: 93-98
- González-Hernández JC, Cárdenas-Monroy CA, Peña A (2004) Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* 21: 403-412
- González-Hernández JC, Peña A (2002) [Adaptation strategies of halophilic microorganisms and *Debaryomyces hansenii* (halophilic yeast)] *Rev Latinoam Microbiol* 44: 137-156
- Gori K, Hébraud M, Chambon C, Mortensen HD, Arneborg N, Jespersen L (2007) Proteomic changes in *Debaryomyces hansenii* upon exposure to NaCl stress. *Fems Yeast Research* 7: 293-303
- Govind NS, McNally KL, Trench RK (1992) Isolation and sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene from the euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii*. *Curr Genet* 22: 191–195
- Gralla E, Vallentine JS (1991) Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu, Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *J Bacteriol* 173: 5918-5920

- Guerzoni ME, Lanciotti R, Marchetti R (1993) Survey of the physiological properties of the most frequent yeasts associated with commercial chilled foods. *Int J Food Microbiol* 17: 329-41
- Guerrero C, Aranda C, DeLuna A, Filetici P, Riego L, Anaya VH, González A (2005) Salt-dependent expression of ammonium assimilation genes in the halotolerant yeast, *Debaryomyces hansenii*. *Curr Genet* 47:163–171
- Gunde-Cimerman N, Ramos J, Plemenit s A (2009) Halotolerant and halophilic fungi. *Mycol Res* 113: 1231-1241
- Gunge N, Fukuda K, Morikawa S, Murakami K, Takeda M, Miwa A (1993) Osmophilic linear plasmids from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Curr Genet* 23: 443–449.
- Gurvitz A, Hiltunen JK, Erdmann R, Hamilton B, Hartig A, Ruis H, Rotteinstainer H (2001) *Saccharomyces cerevisiae* Adr1p governs fatty acid beta-oxidation and peroxisome proliferation by regulating POX1 and PEX11. *J Biol Chem* 276: 31825-31830
- Hallick RB, Chelm BK, Gray WP, Orozco EM (1977) Use of aurintricarboxylic acid as an inhibitor of nucleases during nucleic acid isolation. *Nucleic Acids Res* 4: 3055-3064
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press; Oxford University Press
- Hansberg W (2008) El diox geno y sus especies reactivas. *En: Radicales libres y estrés oxidativo. Mina Konisberg (ed). Manual Moderno. 25-46*
- Havir EA (2003) The in vivo and in vitro inhibition of catalase from leaves of *Nicotiana glauca* by 3-Amino-1,2,4-Triazole. *J App Microbiol* 95: 364–371
- Hernández-Saavedra NY, Ochoa JL (1999) Copper-zinc superoxide dismutase from the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* 15: 657-668
- Hiltunen JK, Mursula AM, Rotteinstainer H, Wierenga RK, Kastaniotis AJ, Gurvitz A (2003) The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 27: 35-64
- H rtner H, Ammerer G, Hartter E, Hamilton B, Rytka J, Bilinski T, Ruis H (1982) Regulation of synthesis of catalases and iso-1-cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae* by glucose, oxygen and heme. *Eur J Biochem* 128: 179-184
- Inoue Y, Matsuda T, Sugiyama K, Izawa S, Kimura A (1999) Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274: 27002-27009

Ismail SA, Deak T, El-Rahman HA, Yassien MA, Beuchat LR (2000) Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature. *Int J Food Microbiol* 62: 113-121

Izawa S, Inoue Y, Kimura A (1996) Importance of catalase in the adaptative response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 320: 61-67

Jaekwon L, Godon C, Lagniel G, Spector D, Garin J, Labarre J, Toledano MB (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem* 274: 16040-16046

Jamieson DJ, Rivers SL, Stephen DWS (1994). Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiol* 140: 3277-3283

Jamieson DJ (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 1511-1527

Jayasree R, Saramma AV (1996) Effect of pesticide and heavy metals on growth of marine yeasts *Candida parolopsis* and *Debaryomyces hansenii*. *Indian J Mar Sci* 25: 373-375

Johnston MA, Delwiche EA (1965) Isolation and characterization of the cyanide-resistant and azide-resistant catalase of *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* 90: 352-356

Jolly NP, Augustyn OPH, Pretorius IS (2006) The role of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *S Afr J Enol Vitic* 27: 15-39

Jones DP (2008) Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol* 295:C849-C868

Kawasaki L, Aguirre J (2001) Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* 183: 1434-1440

Kawasaki L, Wysong D, Diamond R, Aguirre J (1997) Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J Bacteriol* 179: 3284-3292

Köhler K, Domdey H (1991) Preparation of high molecular weight RNA. *Methods Enzymol* 194: 398-405

Koleva DI, Petrova VY, Kujumdzieva V (2008) Comparison of enzymatic antioxidant defense systems in different metabolic types of yeasts. *Can J Microbiol* 54: 957-963

Krauke Y, Sychrova H (2010) Four pathogenic *Candida* species differ in salt tolerance. *Curr Microbiol* 61: 335-339

Krawiec Z, Bilinski T, Schüler C, Ruis H (2000) Reactive oxygen species as second messengers? Induction of the expression of yeast catalase T gene by heat hyperosmotic stress does not require oxygen. *Acta Biochim Pol* 47: 201-207

Kreger-Van Rij NJ, Veenhuis M (1975) Electron microscopy of ascus formation in the yeast *Debaryomyces hansenii*. *J Gen Microbiol* 89: 256-264

Kreġiel D (2008) Physiology and metabolism of crabtree-negative yeast *Debaryomyces occidentalis*. *Sci Bull Tech U Lodz* 72: 35-45

Kuda T, Tanibe R, Mori M, Take H, Michihata T, Yano T, Takahashi H, Kimura B (2009) Microbial and chemical properties of *aji-no-susu*, a traditional fermented fish with rice product in the Noto Peninsula, Japan. *Fish sci* 75: 1499-1506

Kurita O (2003) Overexpression of peroxisomal malate dehydrogenase MDH3 gene enhances cell death on H₂O₂ stress in the ald5 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Microbiol* 47: 192-197

Kurtzman CP, Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 331-371

Kutty SN, Philip R (2008) Marine yeast—a review. *Yeast* 25: 465–483

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Lambeth JD (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4: 181-189

Lepingle A, Casaregola S, Neuveglise C, Bon E, Nguyen H, Artiguenave F, Wincker P, Gaillardin C (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 14. *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*. *FEBS Lett* 487: 82-86

Levy E, Eyal Z, Hochmant A (1992) Purification and characterization of a catalase-peroxidase from the fungus *Septoria tritici*. *Arch Biochem Biophys* 296: 321–327

Li N, Karin M (1999) Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? *FASEB J* 13: 1137–1143

Lin Z, Li WH (2011) Expansion of hexose transporter genes was associated with the evolution of aerobic fermentation in yeasts. *Mol Biol Evol* 8: 131-142

Lopes CA, Rodríguez ME, Sangorrín M, Querol M, Caballero AC (2007) Patagonian wines: the selection of an indigenous yeast starter. *J Ind Microbiol Technol* 34: 539-546

Loureiro V, Malfeito-Ferreira M (2003) Spoilage yeast in the wine industry. *Int J Food Microbiol* 86: 23-50

Luschak VI (2006) Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. *Acta Biochim Pol* 53: 679-684

Lushchak VI and Gospodaryov DV (2005) Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol Int* 29:187-192

Lynch DB, Logue ME, Butler G, Wolfe KH (2010) Chromosomal G + C content evolution in yeasts: Systematic interspecies differences, and GC-poor troughs at centromeres. *Genom Biol Evol* 2: 572-583

Mahoney DJ, Broach JR (1989) The HML matyng-type cassette of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by two separate but functionally equivalent silencers. *Mol Cell Biol* 9: 4621-4630

Marchler G, Shüller C, Adam G, Ruis H (1993) A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J* 12: 1997-2003

Marquina D, Barroso J, Santos A, Peinado JM (2001) Production and characteristics of *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Microbiol Res* 156: 387-391

Mascarenhas C, Edwards-Ingram LC, Zeef L, Shenton D, Ashe MP, Grant CM (2008). Gcn4 is required for the response to peroxide stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cel* 19: 2995–3007

Maté MJ, Zamocky M, Nykyri LM, Herzog C, Alzari PM, Betzel C, Killel F, Fita I (1999) Structure of catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 286:135-149

Mozaffar S, Ueda M, Kitatsuji K, Shimizu S, Osumi M, Tanaka A (1986) Properties of catalase purified from a methanol-grown yeast, *Kloeckera* sp. 2201. *Eur J Biochem* 155: 527-531

Moye-Rowley WS (2002) Transcription factors regulating the response to oxidative stress in yeast. *Antioxid Redox Signal* 4: 123-140

Navarrete C, Siles A, Martínez JL, Calero F, Ramos J (2009) Oxidative stress sensitivity in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* 9: 582–590

Navarro RE, Aguirre J (1998) Posttranscriptional control mediates cell type-specific localization of catalase A during *Aspergillus nidulans* development. *J Bact* 180: 5733–5738

Nelson DP, Kiesow LA (1972) Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV. *Anal Biochem* 49: 474 – 478

Nishikawa A, Tomomatsu H, Sugita T, Ikeda R, Shinoda T (1996) Taxonomic position of clinical isolates of *Candida famata*. *J Med Vet Mycol* 34: 411–419

Norkrans B (1966) Studies on marine occurring yeasts: growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Arch Mikrobiol* 54:374–392

Nucci M, Marr KA (2005) Emerging fungal diseases. *Clin Infect Dis* 41: 521-526

Ochoa JL, Vázquez-Juárez R (2004) Las levaduras marinas como herramientas científica y biotecnológica. *www.ujat/publicaciones/uciencia* 1: 39-50

Ochoa JL, Latisnere-Barragán H (2006) Usos potenciales de las levaduras marinas en México. *Ciencia* 57

Ossowski I, Hausner G, Loewen PC (1993) Molecular evolutionary analysis based on the amino acid sequence of catalase. *J Mol Evol* 37: 71-76

Paiva JA, Pereira JM (2007) Antifungal therapy in the intensive care unit. *In: Infectious diseases in critical care*. J Rello, M Kollef, E Díaz and A Rodríguez (Eds), Springer

Papouska K, Sychrova H (2007) The co-action of osmotic and high temperature stresses results in a growth improvement of *Debaryomyces hansenii* cells. *Int J Food Microbiol* 118: 1–7

Petrovič U (2006) Role of oxidative stress in the extremely salt-tolerant yeast *Hortaea werneckii*. *FEMS Yeast Res* 6: 816–822

Petrovič U, Gunde-Cimerman N, Plemenitās A (2002) Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Mol Microbiol* 45: 665–672

Price VE, Rechcigl M, Hartley RW (1961) Methods for determining the rates of catalase synthesis and destruction *in vivo*. *Nature* 189: 62-63

Prillinger H, Molnár O, Eliskases-Lechner F, Lopandic K (1999) Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. *Antonie van Leeuwenhoek* 75: 267–283

Prista C, Loureiro-Dias MC, Montiel V, García R, Ramos J (2005). Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii* *FEMS Yeast Res* 5: 693-701

Prista C, Almagro A, Loureiro-Diaz MC, Ramos J (1997) Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl Enviromen Microbiol* 63: 4005–4009

Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA (2000) Active and inhibited human catalase structures: Ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol* 296: 295–309

Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A (2001) Unraveling peroxytrite formation in biological systems. *Free Radical Biol Med* 30: 463-488

Ramos J (2005) Introducing *Debaryomyces hansenii*, a salt loving yeast. *Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya* 9: 441-576

Rivas B, Torre P, Domínguez JM, Converti A (2009) Maintenance and growth requirements in the metabolism of *Debaryomyces hansenii* performing xylose-to-xylytol bioconversion in corncob hemicellulose hydrolyzate. *Biotechnol Bioeng* 102: 1062-1073

Rørth M, Jensen PK (1976). Determination of catalase activity by means of the Clark oxygen electrode. *Biochim Biophys Acta* 139: 171–173

Ruis H, Koller F (1997) Biochemistry, molecular and cell biology of yeast and fungal catalases. In: Scandalios JG (ed) *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defences*. Cold Spring Harbor, New York, pp 309–342

Rytka J, Sledziewski A, Lukaszewicz J, Bilinski T (1978) Haemoprotein formation in yeast. III. The role of carbon catabolite repression in the regulation of catalase A and T formation. *Mol Gen Genet* 160: 51-57

Sánchez NS, Calahorra M, Hernández JC, Peña A (2006) Glycolytic sequence and respiration of *Debaryomyces hansenii* as compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23: 361-374

Sánchez NS, Arreguín R, Calahorra M, Peña A (2008) Effects of salts on aerobic metabolism of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* 8:1303–1312

Sánchez Y, Taulien J, Borkovich KM, Lindquist S (1990) HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* 248: 1112-1114

^aScandalios JG (2002) Oxidative stress responses –what have genome-scale studies taught us? *Genome Biol* 3: 1-6

^bScandalios JG (2002) The rise of ROS. *Trends Biochem Sci* 27: 483-486

Schüller C, Brewster JL, Alexander MR, Gustin MC, Ruis H (1994) The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO J* 13: 4382-4389

Seiler H, Busse M (1990) The yeasts of cheese brines. *Int J Food Microbiol* 11: 289-303

Shenton D, Smirnova JB, Selley JN, Carroll K, Hubbard SJ, Pavitt GD, Ashe MP, Grant CM (2006). Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis. *J Biol Chem* 281: 29011–29021

Sherman DJ, Durrens P, Iragne F, Beyne E, Nikolski M, Souciet JL (2006) Génolevures complete genomes provide data and tools for comparative genomics of hemiascomycetous yeasts. *Nuc Acid Res* 34: D432-D435

Sherman DJ, Martin T, Nikolski M, Cayla C, Souciet JL, Durrens P, Génolevures Consortium (2009) Génolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes. *Nucl Acid Res* 37, Database issue: D550–D554

Shull S, Heintz NH, Periasamy M, Manohar M, Janssen YM, Marsh JP, Mossman BT (1991) Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J Biol Chem* 266: 24398 - 24403

Skoneczny M, Rytka J (2000) Oxygen and haem regulate the synthesis of peroxisomal proteins: catalase A, acyl-CoA oxidase and Pex1p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; the regulation of these proteins by oxygen is not mediated by haem. *Biochem J* 350: 313-319

Spencer JFT, Ragout de Spencer AL, Laluce C (2002) Non-conventional yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 147-156

Spevak W, Fessl F, Rytka J, Traczyk A, Skoneczny M, Ruis H (1983) Isolation of the catalase T structural gene of *Saccharomyces cerevisiae* by functional complementation. *Mol Cell Biol* 3: 1545-1551

Storz G, Imlay JA (1999) Oxidative stress. *Curr Op Microbiol* 2: 188-194

Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Curlotta VC (2001) A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem* 276: 38084-38089

Takaç S, Sengel BS (2010) Extracellular lipolytic enzyme activity of a newly isolated *Debaryomyces hansenii*. *Prep Biochem Biotechnol* 40: 28-37

Tanghe A, Prior B, Thevelein JM (2006) Yeast responses to stress. In: Rosa CA, Peter G (eds) *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer, pp 175-195

Teixeira MC, Telob JP, Duarteb NF, Sa-Correia I (2004) The herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces the generation of free-radicals and associated oxidative stress responses in yeast. *Biochem Biophys Res Comm* 324: 1101-1107

Thome, PE and Trench RK (1999) Osmoregulation and the genetic induction of glycerol-3-phosphate dehydrogenase by NaCl in the euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii*. *Mar Biotechnol* (NY) 1: 230-238

Thome-Ortiz PE, Peña A, Ramírez J (1998) Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentrations of KCl and NaCl. *Yeast* 14: 1355–1371

- Trindade H, Karmali A, Pais MS (1988) One-step purification and properties of catalase from leaves of *Zantedeschia aetgiopica*. *Biochimie* 70: 1759-1763
- Turunen O, Seelke R, Macosko J (2009) *In silico* evidence for functional specialization after genome duplication in yeast. *FEMS Yeast Res* 9: 16–31
- Valdez LB, Lores AS, Bustamante J, Alvarez S, Costa LE, Boveris A (2000) Free radical chemistry in biological systems. *Biol Res* 33: 65-70
- van der Walt JP, Taylor MB Liebenberg NVDW (1977). Ploidy, ascus formation and recombination in *Torulasporea (Debaryomyces) hansenii*. *Antonie van Leeuwenhoek* 43: 205-218
- van Roermund CWT, Hettema EH, Kal AJ, Wanders RJA (1998) Peroxisomal β -oxidation of polyunsaturated fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*: isocitrate dehydrogenase provides NADPH for reduction of double bonds at even positions. *EMBO J* 17: 677-687
- Veiga A, Arrabaca JD, Loureiro-Dias MC (2000) Cyanide-resistant respiration is frequent, but confined to yeasts incapable of aerobic fermentation. *FEMS Microbiol Lett* 190: 93-97
- Veiga A, Arrabaca JD, Loureiro-Dias MC (2003) Cyanide-resistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeasts. *FEMS Yeast Res* 3: 239-245
- Veal EA, Day AM, Morgan BA (2007) Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell* 26: 1-14
- Wong B, Kiehn TE, Edwards F, Bernard EM, Marcove RC, de Harven E, Armstrong (1982) Bone infection caused by *D. hansenii* in a normal host: a case report. *J Clin Microbiol* 16: 545-548
- Woodbury W, Spencer AK, Stahman MA (1971) An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal Biochem* 44:301–305
- Wysong DR, Christin L, Sugar AM, Robbins PW, Diamond RD (1998) Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immunol* 66: 1953-1961
- Xolalpa W, Vallecillo AJ, Lara M, Mendoza-Hernández G, Comini M, Spallek R, Singh M, Espitia C (2007) Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics* 7: 3332-3341
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217: 1214-1227

Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*

Yatsyshyn VY, Ishchuk OP, Voronovsky AY, Fedorovych DV, Sibirny AA (2009) Production of flavin mononucleotide by metabolically engineered yeast. *Metab Eng* 11: 163-167

Zamocky M, Furtmüller PG, Obinger C (2008) Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antiox Redox Signal* 10: 1527-1548

Zimniak P, Hartter E, Woloszczuk W, Ruis H (1976) Catalase biosynthesis in yeast: Formation of catalase A and catalase T during oxygen adaptation of *Saccharomyces*. *Eur J Biochem* 71: 393-398