



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DEL PAPEL DE LAS TIORREDOXINAS  
TIORREDUCTASAS TRR1 Y TRR2 EN LA ELIMINACIÓN DE LA  
PERSULFURACIÓN DE LOS RESIDUOS DE CISTEÍNA EN LA  
LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*”**

**Tesis**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**DINORAH ILEANA MORENO DE LA ROSA**



**Ciudad Universitaria, CD. Mx., 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: RODOLFO PASTELIN PALACIOS**

**VOCAL:**               **Profesor: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA**

**SECRETARIO:**       **Profesor: JOSE FRANCISCO TORRES QUIROZ**

**1er. SUPLENTE:**     **Profesor: GENARO JIMENEZ REYES**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: MANUEL GUTIERREZ AGUILAR**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA  
CELULAR, UNAM. LABORATORIO 102 OTE.**

**ASESOR DEL TEMA: DR. JOSÉ FRANCISCO TORRES QUIROZ** \_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. PAOLA MORENO ÁLVAREZ** \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE: DINORAH ILEANA MORENO DE LA ROSA** \_\_\_\_\_

## Agradecimientos formales

Agradezco al Dr. José Francisco Torres Quiroz por haberme permitido trabajar en su laboratorio para sacar adelante este proyecto de tesis, por ser mi guía profesional en este tiempo.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Paola Moreno Álvarez para el desarrollo de este trabajo de tesis.

Esta investigación fue realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT IN209219.

# Agradecimientos

A la mujer de mi vida, mi mamá.

## INDICE

<b>indice</b> .....	<b>5</b>
Resumen.....	1
<b>Marco teorico</b> .....	<b>2</b>
La importancia del H <sub>2</sub> S .....	2
La singularidad de la Cisteína.....	4
Persulfuración.....	6
Tiorredoxinas.....	9
Sistema tiorredoxina en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	10
Eliminación de la persulfuración por tiorredoxinas y tiorredoxinas reductasas.....	11
<b>Justificación del proyecto</b> .....	<b>14</b>
<b>Pregunta de investigación</b> .....	<b>14</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>14</b>
<b>Objetivo general</b> .....	<b>14</b>
<b>Objetivos particulares</b> .....	<b>15</b>
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>16</b>
Cepas.....	16
Diseño de oligonucleótidos.....	17
Plásmidos .....	18
PCR para delección: OBTENCIÓN DE MUTANTES SENCILLAS .....	19
Transformación de levaduras.....	20
Elección de colonias “mutantes” y extracción de DNA genómico.....	20
Oligonucleótidos y PCR para confirmación de colonias mutantes.....	21
Obtención de células competentes <i>trr2Δ</i> .....	22
GENERACIÓN DE dobles mutantes <i>trr1Δtrr2Δ</i> .....	23
Extracción y marcaje de proteínas persulfuradas MEDIANTE EL SWITCH DE Biotina MODIFICADO.....	23
Western Blot .....	24
<b>Resultados</b> .....	<b>25</b>
Obtención de mutantes sencillas <i>trr1Δ</i> y <i>trr2Δ</i> .....	25
Generación de la doble mutante <i>trr1Δtrr2Δ</i> .....	31
Evaluación del nivel de persulfuración en las cepas mutantes generadas .....	33
<b>Discusión</b> .....	<b>36</b>
<b>Conclusión</b> .....	<b>40</b>
<b>Perspectivas</b> .....	<b>40</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>41</b>

---

## RESUMEN

Las tiorredoxinas son proteínas pequeñas que tienen distintas actividades dentro de la célula. La principal es mantener un balance del estado redox, es decir tienen actividad de oxidoreductasa. Existen dos sistemas de tiorredoxinas en la célula: citoplasmático y mitocondrial; cada uno con sus tiorredoxinas y sus tiorredoxinas tiorreductasas (enzimas encargadas de reducir a las tiorredoxinas). Se sabe que están altamente conservadas sobre todo en su dominio catalítico; podemos encontrarlas en todos los reinos, así como en eucariontes sencillos (levaduras) y hasta eucariontes complejos (humano, plantas y animales).

En su actividad de oxidoreductasa está muy bien documentado que son las encargadas de quitar los puentes disulfuro formados entre los residuos de cisteína de las proteínas (C-S-S-C); pero en los últimos años se ha reportado que por lo menos en humanos también son las encargadas de eliminar la persulfuración en los residuos de cisteína. La persulfuración es una modificación post-traduccional que puede regular tanto positiva como negativamente la actividad de las proteínas.

La persulfuración de proteínas depende del gas  $H_2S$ . Este gasotransmisor celular (el 3ro más importante junto con CO y NO) es el donador del grupo -SH para que los residuos de cisteína de las proteínas se puedan persulfurar.

En este trabajo nos dimos a la tarea de investigar algunos de los componentes que eliminan la persulfuración en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Estudiamos cual es el papel de las tiorredoxinas tiorreductasas *TRR1* (cistoplasma) y *TRR2* (mitocondria). Usamos mutantes sencillas y dobles de estos genes, y marcamos las proteínas persulfuradas mediante la técnica del switch de biotina modificado. Identificamos que existe un aumento en el nivel de persulfuración en las mutantes sencillas *trr1* y *trr2*, pero sorpresivamente en la doble mutante *trr1trr2* el nivel de persulfuración es menor que en las mutantes sencillas y la WT.

LA IMPORTANCIA DEL H<sub>2</sub>S

El H<sub>2</sub>S es una molécula pequeña altamente tóxica que en los últimos años ha emergido debido a su papel como compuesto de señalización tanto en funciones fisiológicas como en condiciones patológicas en animales y plantas. Es considerado como el tercer gasotransmisor en células de animales y plantas, siendo igual de importante que el óxido nítrico (NO), el monóxido de carbono (CO) y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).<sup>1</sup> Esta molécula tan pequeña es altamente permeable a la membrana celular y así actúa como molécula señalizadora. Se sabe que el H<sub>2</sub>S en animales está involucrado en distintos procesos como proliferación celular, apoptosis, procesos inflamatorios, protección contra la

hipoxia, neuromodulación y cardioprotección; mientras que en plantas se relaciona con la modulación de la fotosíntesis y la regulación de la autofagia, etc.<sup>1,2</sup>

Una de las principales propiedades que diferencia al H<sub>2</sub>S de los otros gasotransmisores es su capacidad de disociación bajo condiciones fisiológicas, se cree que el “pool” de H<sub>2</sub>S consiste en H<sub>2</sub>S, HS<sup>-</sup> y S<sup>2-</sup>; predominando el HS<sup>-</sup> en aproximadamente un 80%.<sup>3</sup>

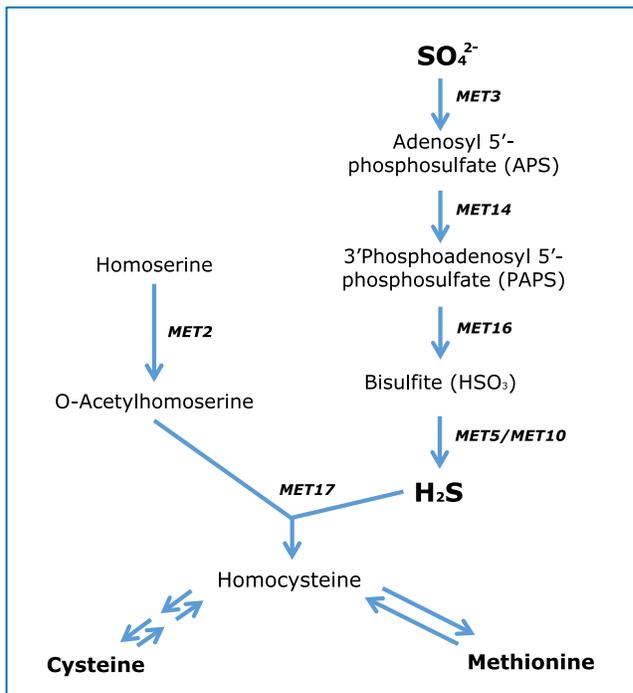


Figura 1. Vía de asimilación de sulfato, en *Saccharomyces cerevisiae* (Kizurik et al, 2016).

En mamíferos la generación de H<sub>2</sub>S endógeno sucede gracias a la ruta de la transulfuración; vía metabólica en donde la transferencia de azufre de homocisteína a cisteína ocurre, dejando distintos metabolitos de azufre como, cisteína, GSH y H<sub>2</sub>S. Dentro de esta ruta se encuentran 2 enzimas orquestadoras: cistationina  $\gamma$ -liasa (CSE) y cistationina  $\beta$ -sintasa (CBS); las cuales dan lugar al H<sub>2</sub>S en citoplasma. También existe otra enzima, 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa (3MST) también productora de H<sub>2</sub>S en citoplasma y mitocondria<sup>14</sup>. En plantas existe la enzima L-cisteína desulfhidrasa 1 (DES1), responsable de la producción citosólica de H<sub>2</sub>S endógeno<sup>5</sup>.

Mientras que en levadura la vía que da mayor aporte en la generación de H<sub>2</sub>S es la asimilación de sulfato inorgánico <sup>6</sup>(Fig1). El rol principal del H<sub>2</sub>S es donar el azufre para la síntesis de los aminoácidos cisteína y metionina.

Este gasotransmisor tiene distintas maneras de señalizar, todo depende de en que forma se encuentre, pero se ha reportado que uno de los principales mecanismos por los cuales ejerce su función es por la modificación post-traduccional de los residuos de cisteína en proteínas blanco, mediante un proceso llamado persulfuración<sup>2,7</sup>.

## LA SINGULARIDAD DE LA CISTEÍNA

Un residuo de cisteína (Cys) contiene en su cadena lateral un grupo tiol (-SH) como grupo funcional (Figura 2); este residuo es poco abundante en las proteínas (aproximadamente el 2% de todos los residuos son cisteína), pero su versatilidad química hace de este residuo un determinante crítico en el funcionamiento y estructura de las proteínas.<sup>3</sup>

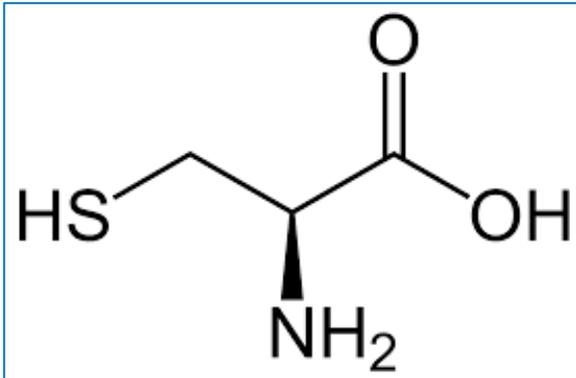


Figura 2. Estructura de la cisteína

El átomo de azufre de la cisteína puede tomar distintos estados de oxidación (-2 a +6) y dependiendo del estado en que se encuentre será su comportamiento; por ejemplo el azufre del tiol o sulfhidrilo de la cisteína se encuentra en su estado de oxidación mas bajo (-2) que lo hace acreedor de un carácter

nucleofílico muy fuerte y por lo tanto susceptible a la oxidación o bien considerado como agente reductor. Mientras que el disulfuro de la cisteína le confiere un comportamiento electrofílico o agente oxidante.<sup>1,3</sup>

Los residuos de cisteína en las proteínas tienen importantes funciones fisiológicas. Proveen la unión covalente de proteínas y subunidades de proteínas, representan el grupo funcional activo redox de muchas enzimas, tienen un rol como señalizadores redox y actividad importante en la búsqueda de proteínas oxidadas que a su vez están involucradas en mecanismos antioxidante del organismo. Muchas de estas propiedades fisiológicas son mediadas por la promiscuidad redox de la cisteína.<sup>8</sup>

El estado de protonación en el que se encuentra el tiol tiene un efecto muy marcado en su reactividad con agentes oxidantes. En general cuando se encuentra desprotonado, es decir en forma de tiolato (S<sup>-</sup>) exhibe una mayor reactividad con oxidantes electrofílicos<sup>3</sup>. Una de las peculiaridades del sulfhidrilo de la cisteína es que su constante de disociación (pK<sub>a</sub>) depende del ambiente

local donde se encuentre y de la arquitectura de la proteína, todo esto determinando la reactividad que pueda tener el tiol. Los residuos Cys con bajos valores de  $pK_a$  existen predominantemente como tiolatos a pH fisiológico. Mientras que a valores altos de  $pK_a$  se encuentra protonado el azufre. Se ha reportado que los valores de  $pK_a$  pueden variar de manera dramática, desde rangos de 2.5 a 12.

1

Esta diversidad química otorga a la cisteína una gran capacidad para estar involucrada no solo con las funciones antes mencionadas, sino con modificaciones post-traduccionales oxidativas de cisteína (Ox-PTM)), incluyendo: S-nitrosilación (SNO), S-glutationilación (SSG), puentes disulfuro (RS-SR), sulfenilación (SOH), ácido sulfínico ( $SO_2H$ ), ácido sulfónico ( $SO_3H$ ) y persulfuración (SSH), siendo esta última la más reciente en ser caracterizada.<sup>7,8</sup> Todas estas modificaciones son estimuladas por pequeñas moléculas difusibles como el  $H_2S$  o RSS (especies reactivas de azufre), las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS). La mayoría de estas modificaciones son reversibles, aunque existen algunas excepciones (Figura 3)<sup>9</sup>. A las reacciones que son reversibles también se les consideran como reacciones protectoras para así evitar que la cisteína pase a modificaciones que le impidan regresar a su forma original. Pueden ser devueltas a tiol libre (SH) ya sea por algún sistema de defensa antioxidante, o por otro lado, transformarse hacia otra modificación postraducciona dependiendo del estado redox de la célula. La formación de cualquiera de estas modificaciones de forma individual depende de distintos factores, como la reactividad del residuo de cisteína, el ambiente que rodea a la proteína y el ambiente local redox.<sup>2,8,10,11</sup>

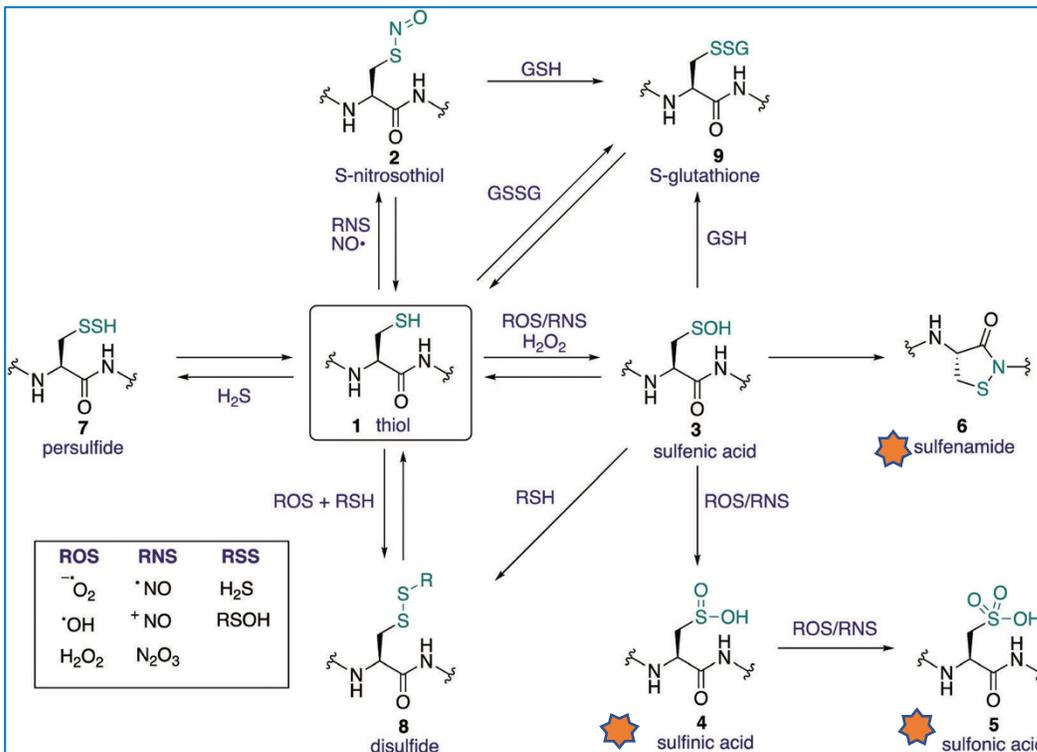


Figura 3. Ox-PTM en cisteína. Reacciones reversibles o modo protector: persulfuración, nitrosilación, puente disulfuro, glutatiónilación, sulfenilación. A partir de la sulfenilación se pueden derivar reacciones irreversibles. ⚡ Reacciones irreversibles conforme aumentan las concentraciones de ROS, RSS o RNS (Alcock et al, 2018)

## PERSULFURACIÓN

La persulfuración, como se mencionó anteriormente, es una modificación postraducciona oxidativa de cisteína. Es el mecanismo principal por el cual señaliza el  $\text{H}_2\text{S}$ . El  $\text{H}_2\text{S}$  media la conversión del tiol (-SH) de la cisteína a un persulfuro (-SSH), pero para que esto ocurra la cisteína debe ser previamente oxidada puesto que el  $\text{H}_2\text{S}$  no puede reaccionar de manera directa con el tiol<sup>1</sup>. Se han propuesto diversos mecanismos por los cuales se lleva a cabo la persulfuración: 1) el  $\text{H}_2\text{S}$  reacciona con ácido sulfénico (-SOH) para después poder formar el persulfuro; 2)  $\text{H}_2\text{S}$  puede reaccionar con cisteínas S-nitrosiladas (-SNO) y posteriormente formarse el persulfuro; 3)  $\text{H}_2\text{S}$  puede reaccionar con un puente disulfuro (-S-S-) entre cisteínas y así formarse el -SSH; 4) un persulfuro puede fungir como acarreador del grupo sulfhidrilo hacia una cisteína a través de

una reacción de *trans-S-sulfhidración*; 5) la reacción entre especies de azufre oxidadas como polisulfuros con el tior de una cisteína (Figura 4)<sup>1,2,7</sup>.

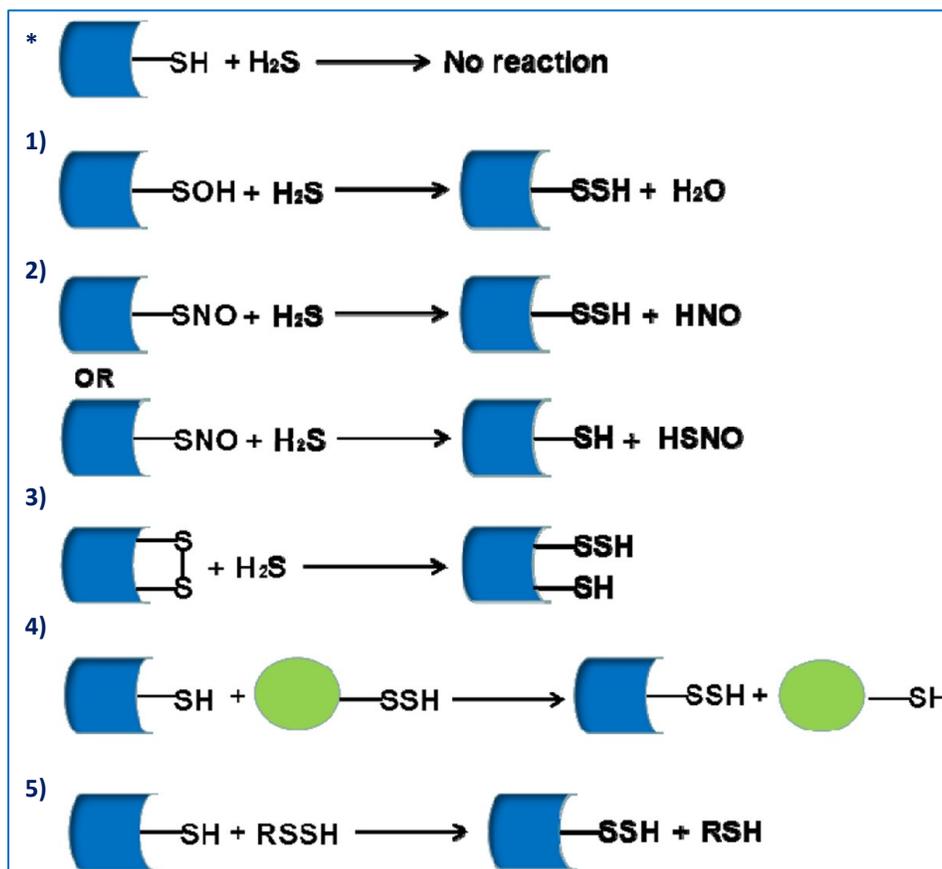


Figura 4. Mecanismos propuestos para la formación de proteínas persulfuradas; \*El  $\text{H}_2\text{S}$  no puede reaccionar con el tior de la cisteína de manera directa; 1) una cisteína sulfenilada puede reaccionar con el  $\text{H}_2\text{S}$ ; 2) una cisteína nistrosilada reacciona con el  $\text{H}_2\text{S}$  para formar el persulfuro o también puede solo quitar el grupo NO y volver a dejar la cisteína con su grupo tior; 3) un puente disulfuro entre dos cisteínas puede reaccionar con  $\text{H}_2\text{S}$  y formar una proteína con una cisteína persulfurada y la otra con su grupo tior; 4) proceso de *trans-S-sulfhidración* entre una proteína persulfurada y una cisteína; 5) reacción de polisulfuro con una cisteína. (imagen modificada de Da Zhang et al, 2017).

La persulfuración o S-sulfhidración está involucrada en muchos procesos fisiológicos y patológicos. Después de la persulfuración, las proteínas pueden cambiar por completo su función original, derivando a que confiera la función de reguladores negativos o positivos, que después de la persulfuración se active la proteína o se inactive, o bien que modifique su interacción con otras proteínas.

Algunas de las funciones en las que está implicada esta modificación post-traduccional son (Tabla 1): regulación de la apoptosis, diferenciación celular, proliferación celular, metabolismo celular, bioenergía y biogénesis mitocondrial,

vasorelajación, estrés oxidativo. También se le considera como una modificación protectora de las proteínas, para así evitar que ocurra alguna reacción que sea irreversible. Aunado a lo ya mencionado, esta modificación post-traducciona no depende de alguna enzima para llevarse a cabo, contrario a lo que ocurre con otras modificaciones.

Así como esta modificación regula ciertos procesos celulares, debe haber un procesos celular que regule a la persulfuración. No se debe pasar por alto que el tener proteínas persulfuradas es sinónimo de proteínas oxidadas o bien el aumento de un ambiente oxidativo en la célula.

<b>Proteína modificada</b>	<b>Actividad de la proteína</b>	<b>Función</b>	<b>Referencia</b>
IRF-1	+	Mantiene replicación de DNA mitocondrial	Li, Yang, 2016 <sup>12</sup>
Keap1	-	Protege a la célula del estrés oxidativo	Zhang et al. 2017 <sup>2</sup>
Parkina	+	Mejora la ubiquitinación en líneas celulares neuronales y reduce muerte celular en modelo de enfermedad de Parkinson	Vandiver et al., 2013 <sup>13</sup>
AR	-	Suprime proliferación celular en cáncer de próstata	Zhao et al., 2014 <sup>14</sup>
GATA3	-	Controla diferenciación de esplenitos y regula desarrollo de asma alérgica	Wang et al., 2017 <sup>15</sup>
Subunidad p65 de NF- $\kappa$ B	+	Suprime apoptosis por TNF- $\alpha$ en hígado y macrófagos	Zhang et al., 2017 <sup>2</sup>
Kir6	+	Media la vasorelajación colinérgica y la hiperpolarización	Zhang et al. 2017 <sup>2</sup>

Tabla 1. Ejemplos de proteínas persulfuradas y la actividad que tienen.

## TIORREDOXINAS

El sistema tiorredoxina consiste en dos enzimas antioxidantes oxidoreductasas, tiorredoxina (Trx) y tiorredoxina reductasa (TrxR); esta última encargada de reducir a la tiorredoxina. No se tienen reportes de la existencia de alguna otra proteína capaz de reducir a las tiorredoxinas. Este sistema se encuentra dividido en dos: uno citoplasmático y otro mitocondrial, cada uno con su propia Trx y TrxR<sup>10</sup>. Estas proteínas las podemos encontrar en mamíferos, eucariontes sencillos y procariontes.

En el caso de mamíferos, en citoplasma se encuentra la tiorredoxina Trx1, así como la tiorredoxina reductasa TrxR1. Mientras que en mitocondria se tiene a la tiorredoxina Trx2 y su reductasa TrxR2. Si bien en eucariontes superiores existen muchas isoformas de estas Trx, las más estudiadas son la 1 y la 2.

Estas oxidoreductasas son proteínas de aproximadamente 58kDa (TrxR) y 12kDa (Trx), con un dominio catalítico Cys-Gly-Pro-Cys altamente conservado, esencial para su función como potente oxidoreductasa de puentes disulfuro. En general se trata de un sistema donde las Trx reducen a las proteínas que tienen puentes disulfuro (S-S), y las TrxR que son dependientes de NADPH reducen el disulfuro del sitio activo de la Trx oxidada (Figura 5). Si bien Trx no puede ser reducida por otra proteína que no sea TrxR, pero TrxR si es capaz de reducir a otros sustratos<sup>10,16</sup>.

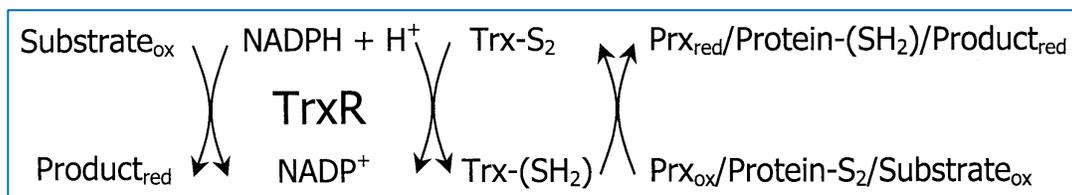


Figura 5. Reacciones enzimáticas del sistema tiorredoxina. La tiorredoxina reductasa (TrxR) reduce el disulfuro del sitio activo de Trx, así como otros sustratos, siendo dependiente de NADPH. Las tiorredoxinas reducidas son altamente eficientes en reducir los disulfuros de proteínas, como en las peroxirredoxinas (Prx) y el disulfuro del glutatión (GSSG). (Nordberg J. y Arnér E. 2001)

La primer función que se encontró de este sistema (las Trx específicamente) era que participaban como donadora de hidrógeno de la ribonucleotido reductasa para la síntesis de dNTP's necesarios para la replicación de DNA. Pero el rol principal

que tiene este sistema es el de mantener un balance del estado redox en la célula, junto a otros sistemas. Se hace énfasis en este en particular porque tiene un amplio espectro de reacción con distintas proteínas. Pueden reducir al glutatión u otras proteínas relacionadas al balance redox, mientras estas no pueden ser reducidas por otras enzimas que no sean las TrxR<sup>17,18</sup>.

Además las Trx reducidas previenen la apoptosis a través de la unión inhibitoria a la cinasa reguladora de señal de apoptosis 1 (ASK1)<sup>19</sup>, donde esa unión se pierde cuando Trx se encuentra oxidada. Muchas condiciones clínicas involucran a estas oxidorreductasas, de hecho se han considerado un blanco para disminuir la respuesta inmune exacerbada<sup>20</sup>. De manera muy novedosa se están usando como blanco a las tiorredoxinas para modular la señalización redox y ligarlo a tratamientos contra el cáncer.<sup>21</sup>

---

#### SISTEMA TIORREDOXINA EN *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* al igual que eucariontes superiores cuenta con dos sistemas de tiorredoxinas (mitocondrial y citoplasmático). Las tiorredoxinas reductasas son llamadas Trr1 y Trr2<sup>16,22</sup>. Estas dos enzimas son parálogas, por lo que la secuencia que codifica a los respectivos genes son muy parecidas, pero difieren en el promotor y terminador (Figura 7).

En el sistema citoplasmático a diferencia de lo ya mencionado, *S. cerevisiae* tiene dos tiorredoxinas (Trx1 y su parálogo Trx2), de esta forma la que se encuentra en mitocondria lleva por nombre Trx3<sup>23</sup>. Trx1 y Trx2 mantienen el mismo papel, pero se ha visto que Trx2 regula de manera mas eficiente el estrés oxidativo causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>16</sup>.

Estas oxidorreductasas también parecen estar relacionadas con el metabolismo del azufre, se cree que son las únicas proteínas capaces de donar hidrógenos a la Fosfoadenosin Fosfosulfato reductasa (PAPS reductasa) que convierte al 3'-

fosfoadenosin 5'-fosfosulfato a sulfito, ya que se ha observado que las cepas mutantes de tiorredoxinas son deficientes en la asimilación de sulfato<sup>22</sup>.

El mecanismo por el cual ejercen su función como reguladoras del estado redox es el mismo, pero esta vez tanto Trx1 como Trx2 son partícipes en citoplasma<sup>23</sup> (Figura 6). Una incógnita que se mantiene es el por qué en citoplasma existen dos tiorredoxinas si donde suelen generarse mas ROS es en mitocondria.

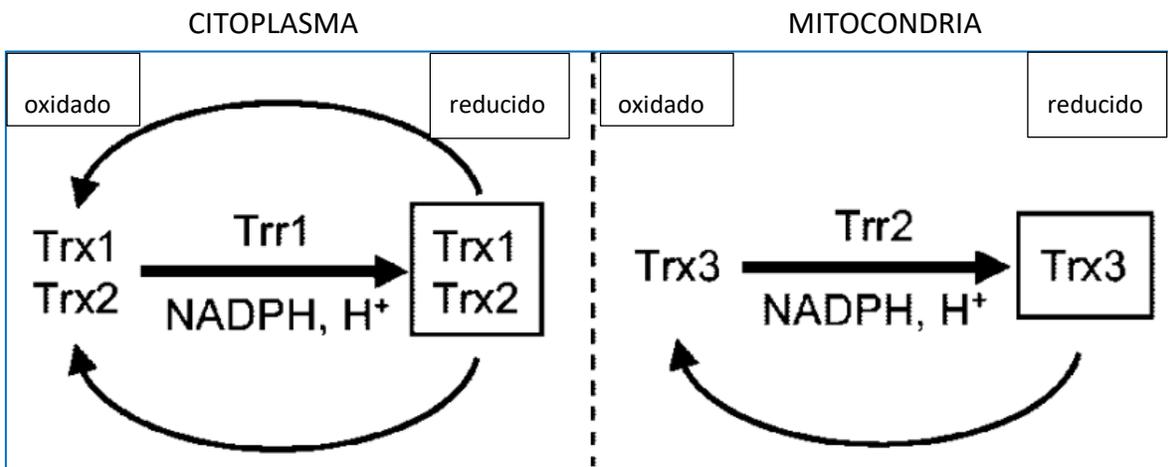


Figura 6. Mecanismo general de las tiorredoxinas en *Saccharomyces cerevisiae*. Del lado izquierdo se tiene el sistema que pertenece al citoplasma donde Trx1 y Trx2 se oxidan para reducir a las proteínas oxidadas por puentes disulfuro, a su vez Trr1 dependiente de NADPH reduce a las Trx1 y Trx2, y así el ciclo se repite. Lo mismo sucede en mitocondria, pero con Trx3 y Trr2. Imagen modificada de Trotter E. y Grant C, 2004.

## ELIMINACION DE LA PERSULFURACION POR TIORREDOXINAS Y TIORREDOXINAS REDUCTASAS

La persulfuración al ser un mecanismo de señalización necesita ser controlado, por eso se han propuesto distintos sistemas que podrían estar involucrados en esta regulación. Debido a que la reacción por excelencia que realizan las tiorredoxinas es la reducción de los puentes disulfuro y su participación en la regulación del balance redox; han sido propuestas como enzimas reguladoras de la persulfuración<sup>24,25</sup>.

En dos estudios recientes, el primero realizado por Dóka et al. en 2016 demostró que en la línea celular HEK293 de riñón de embrión humano, así como en hígado de ratón *knockout* para TrxR1 o bien con expresión a la baja de la misma proteína se observa un aumento en el nivel de persulfuración, así como una menor viabilidad cuando se ponía en contacto con cantidades tóxicas de polisulfuros<sup>25</sup>.

El segundo estudio de la mano de Rudolff Wedmann y Constantin Onderka también en 2016, observaron en pacientes con HIV que el sistema Trx/TrxR funge como despersulfuridasa y que tiene casi el mismo orden de magnitud de reacción que en la eliminación de puentes disulfuro<sup>24</sup>.

Estos dos estudios proporcionan información donde por lo menos en humanos y en ratón el sistema Trx/TrxR podría actuar como regulador de puentes disulfuros así como de la persulfuración.

Como se mencionó, existen estudios del papel de este sistema como posible despersulfuridasa en modelos murinos así como en humanos, pero en levadura aún no se tienen reportes donde las tiorredoxinas sean partícipes en la eliminación de la persulfuración de las proteínas o bien que tengan alguna relación con esta modificación post-traducciona.

**A**

NW Score	Identities	Gaps	Strand
-297	152/332(46%)	63/332(18%)	Plus/Plus
Query 1	AC-----GCTTCAGTA-TAC---AGT-ACGGCAG---TAAGTGTTCATTCT-GTTC		43
Sbjct 1	GACAGAGAGGGCTCGAGTACTTCCTCAATCACATCATCCTTAACAGCAGCCTCGTAGAAA		60
Query 44	TG-----GATTAATAATCTTTCACCTTGCCCTAGCCATTTGGGGCGGGTTTGGCTGGG		97
Sbjct 61	TGACCAAGAT--ATACTCATACAGTTCTAGAGCC--TTCAAAACGAGTT--GCATAGC		114
Query 98	TTAGTTCCTCCTTAGTCATGGAGAAAAAAA---ATCGCCCGCAAGTATCTCGAAAAAGGA		154
Sbjct 115	TCACCATC-CCTATCCAACCGACTTCTTCTCATCGACTACTACTATCCC-----A		165
Query 155	AAAAATGCCACGCGTATAAGAGTGGACCCAACT-GCTCGAGGTTCAA-GAGCTGTAG		212
Sbjct 166	TTTAACTCGGGGCGGT-TGTTAATTAATC--ACTCGATGGGAATGCCTTGAGCTGACCG		222
Query 213	--ATTAATTTCTAGTTCAGTTATACTTGCCCTACAAGTGCTATACAGCAAAATAGCGAAC		270
Sbjct 223	CAATGAAAACTTTAG---GGGATCGT--CCAACAT-----TAAAGGAAGAA-CGAAA		269
Query 271	AGTACG--AAAGTAAACATCATATATCAATA	300	
Sbjct 270	CGGCTCCACAGTTCTAATATATA-ATAACA	300	

**B**

NW Score	Identities	Gaps	Strand
620	740/1036(71%)	83/1036(8%)	Plus/Plus
Query 1	ATG-----GTT---CA-----CAA-----		11
Sbjct 1	ATGATAAAACATATAGTTTCGCCATTCAGGACGAATTTTGGCATCAGCAAGTCCGCTG		60
Query 12	-----CAAAGTTACTATCATTTGGTTCAGGTCAGCTGCACACACC		51
Sbjct 61	CTGTCAAGGATGATTCATCACAAGGTTACAATCATAGTTCTGGCCCGCTGCCACACC		120
Query 52	GCCGCATCTATTTGGCCAGGGCAGAAATCAAGCCAATCCTATATGAAGTATGATGGCG		111
Sbjct 121	CTGCTATATACTTTGGCAAGAGCAGAGATGAAGCCACATATATGAGGGAATGATGGCC		180
Query 112	AACGGTATGCTGCGCGTGGCCAGCTAACACCACCTACAGAAATCGAAAATTCCCAGGT		171
Sbjct 181	AACGGAAATGCTGCTGGTGGCCAAATGACAACAACCAGGATATCGAAAATTTCCAGGG		240
Query 172	TTCCAGAA-TGGTCTAACAGGTAGCGAATGATGGACAGAATGAGAGAACAATCCAGAA		230
Sbjct 241	TTTCTCGAATCGT-TGATGGCAGTGAATGATGGAGAGGATGAGGAAACAATCTGCCAA		299
Query 231	CTTTGGCACTGAATTTATCAAGGAAACAGTTTCCAAAGTTGATCTGCTTCCAAACCAAT		290
Sbjct 300	GTTTGGCACTAACATAATACCAGACTGTCTCAAAGTGCATTTATCTTCAAACCAAT		359
Query 291	CAAGCTATGACCGAATTTAACGAAGCAGAACCTGTGACGACTGACGCTATAATCTT		350
Sbjct 360	CAGATATGACCGAATTTAATGAGGATGCAGAGCCTGTGACCACTGATGCTATAATCTT		419
Query 351	GGCCACAGCGCTTCTGCTAAGAGAATGCATTTGCCGGGGAGGAAACCTACTGGCAAAA		410
Sbjct 420	GGCCACAGCGCTTCCGCTAAGAGAATGCATTTACCAGGGGAGGAAACCTACTGGCAGCA		479
Query 411	AGTATTTCTGCCTGTGCGGTGTGATGTTGCCCGTCCCAATTTTCAGAAAACAGCCAT		470
Sbjct 480	GGGAATATCTGCCCTGTGCTGATGATGTTGCCCGTCCCAATTTTAGAAAACAGCCAT		539
Query 471	GGCCGTCATTTGGTGGTGGTACTGTCATGTGAAGAAGCTCAGTTCTTGACCAAGTACGG		530
Sbjct 540	GGCCGTTATTTGGTGGTGGTACTGCTGCTGAGGAAGCGAATTTCTACGAAGTATGC		599
Query 531	CTCAAAGTGTATATGCTTGTGAGAAAAGACCATTTGCCGTCTTACCATTATGCAAAA		590
Sbjct 600	GTCGAAAGTATATATATAGTAAGAAAAGGATCATTTTCGTGATCTGTAATAATGCAGAG		659
Query 591	CGCTGCTGAGAGAA-CGAAAA--ATTGAATCCTTTACACACTGTTGCGCTGAGAAC		647
Sbjct 660	ACGAATTGAGAAAAATCCAAACATCATG---TTTGTTCACACAGTTGCATGAGAAGC		716
Query 648	TAAGGGGATGTAATTTGAATGCTTGAAGATTAAGAACACTAAAAGAATGAAGA		707
Sbjct 717	TAAGGGTATGTAAGTTATGAATGCTTGAAGATTAAGAATCTAAAAGTAAATGTGA		776
Query 708	AACCGAATTTGCCAGTCAGCGGTTATTTTATGCAATTTGCCACACTCCAGCAACAAAGAT		767
Sbjct 777	GAACGATTTAGAAATTAATGGACTATTTACACAATAGGTCACAGCCCTGCCACAGATAT		836
Query 768	TGTCGCTGCCAAGTCGACACTGATGAAG---CGGGCTACATTAACACTGTCCCAGGCAG		824
Sbjct 837	AGTTAAAGGACAAGTAGA---TGAAGAAGAGACGGGGTATATAAAAACGTGCTGGATC		893
Query 825	CTCATTAACCTCCGTTCCAGGATTTTTCGCTGCTGCTGATGTTGAGATTTCAAATACAG		884
Sbjct 894	GTCCTGACTCTGTCAGGTTTTTTTTCGCTGAGTGCAGTTGAGACTCTAGGTATAG		953
Query 885	ACAAGCTATTAATTTCTGCTGGCTGGTTGATGCGCCGCTTTGGATGCTGAGAAATACTT		944
Sbjct 954	ACAGCAGTTACTTCTGCTGGTTCGGATGATCTGCTGCTTTGGATGCTGAGAACGTTACT		1013
Query 945	AACCTCCCTAGAATAG	960	
Sbjct 1014	AAGTGCCCAAGAGTAA	1029	

**C**

NW Score	Identities	Gaps	Strand
-231	164/326(50%)	52/326(15%)	Plus/Plus
Query 1	A-TGAATTTCCATTATAAAAATAGAT--ACACTCAAATTTTGTATACCTTATCCAACAA		56
Sbjct 1	CGTGAAAAAACCGGTTTATTTTGTTTTACTGTTCCGATTGT-GT-TACGTATCTAT--		56
Query 57	ATCGTTACTT---TCTCCTT---TCTTTAATAAAAAGCAAAACCATGAATTT---TAT		105
Sbjct 57	---GTTTTTGAGATATATTTGAAAATTTTTATAAGATACATAT-ATATATGTGCGTAT		112
Query 106	TTCTTTCCCAATTATAGAGAAAGCCAAATACATAATACATAATTTG-CGTGCTGA-		163
Sbjct 113	TGCTG--CGACAAAAGAGAGCA---ARGAGATGGCGTTGAR-RTTGCCGAGACAAAG		166
Query 164	ATTAA-ACTTT--TTAGACA-CATGACATAGGCCATCGGCTTACTTTGTAACGCTGGTT		219
Sbjct 167	AGGAGACATTAATTAATCATCTTTTAAAGGGATTTTTTACTT-GCAA-GCTT--TT		222
Query 220	GCCTATACCCGACTATTA-AGTTATGACTAATATATTTGCTGGCCTTCCC--CACCT		274
Sbjct 223	G-----ACCTGCTCTTAGTTTTTTTACTTCCCTGAAATTTCTTCAAAGTACCCT		275
Query 275	GCATTTTTCTGTGCTCTTTGCCAAA	300	
Sbjct 276	TCAGTCTGATCTT-TCGTTAACAA	300	

**Figura 7. Alineamiento de secuencias de nucleótidos de TRR1 y TRR2;** A) Alineamiento de los promotores; B) Alineamiento de los genes TRR1 y TRR2; C) Alineamiento de los terminadores. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

## JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Los dos estudios realizados donde observan que este sistema (Trx/trxR) puede comportarse como despersulfuridasa, dan pauta a pensar que en otros modelos podría ocurrir lo mismo, ya que como se ha visto las tiorredoxinas están altamente conservadas, pero no se debe dejar a un lado que en sistemas más complejos existen distintas isoenzimas y eso podría ser una variable para que no exista el mismo comportamiento.

Es por eso que nos dimos a la tarea de averiguar el papel que tienen las tiorredoxinas reductasas Trr1 y Trr2 en la regulación de la persulfuración creando mutantes sencillas y dobles para estos genes en *Saccharomyces cerevisiae* y así evaluar si existe una relación distinta entre cada reductasa con las mutantes sencillas y observar qué sucede cuando la célula se encuentra sin el sistema de tiorredoxinas reductasas de funcional (doble mutante).

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las enzimas TRR1 y TRR2 de *Saccharomyces cerevisiae* participan en la regulación de la persulfuración de las proteínas?

## HIPÓTESIS

Si se deletan los genes que codifican para las tiorredoxinas reductasas (*TRR1* y *TRR2*) en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, entonces el nivel de persulfuración de las proteínas aumentará dando indicativo que la regulación de esta modificación post-traducciona es llevada a cabo por las tiorredoxinas reductasas.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar si las tiorredoxinas reductasas participan en la eliminación de la persulfuración de proteínas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener las mutantes de los genes *TRR1* y *TRR2*
- Obtener la doble mutante *trr1Δtrr2Δ*
- Mediante el *switch* de biotina identificar los grupos persulfuro de las proteínas y observar el efecto que tienen la ausencia de las tiorredoxinas reductasas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CEPAS

<b>Cepa</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Referencia</b>
<b>BY4742 (WT)</b>	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	26
<b><i>trr1<math>\Delta</math></i></b>	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <i>trr1<math>\Delta</math>:: hph</i></i>	Este trabajo
<b><i>trr2<math>\Delta</math></i></b>	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <i>trr2<math>\Delta</math>:: hph</i></i>	Este trabajo
<b><i>trr1<math>\Delta</math>trr2<math>\Delta</math></i></b>	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <i>trr1<math>\Delta</math> trr2<math>\Delta</math>:: kanMX:: hph</i></i>	Este trabajo

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo.

## DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Se diseñaron oligonucleótidos *Forward* de 69 nucleótidos: 50 nucleótidos antes del ATG de cada gen a deletar (*TRR1*, *TRR2*), seguidos de 19 nucleótidos de una secuencia universal plasmídica. Los oligonucleótidos *Reverse* se diseñaron con 50 nucleótidos antiparalelos después del codón de stop y 19 nucleótidos de una secuencia universal plasmídica. Todo se diseñó con ayuda del software Serial Cloner 2.6. Los oligonucleótidos fueron sintetizados en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular (IFC, UNAM). Y así, mediante una PCR utilizando como templado los plásmidos de la tabla 3 de manera independiente que contienen la secuencia universal plasmídica en su genoma, se obtendrá como producto, el marcador de resistencia del plásmido flanqueado por secuencias homólogas que también flanquean al gen en cuestión (Ya sea *TRR1* o *TRR2*, dependiendo los oligonucleótidos que se utilicen) Figura 8. Entonces por un proceso de doble recombinación homóloga de este producto con el genoma de la levadura, se escindiría el gen blanco y en su lugar estará el casete de resistencia del plásmido que se haya utilizado (Figura 10).

Gen	Secuencia 5' → 3'
<b><i>TRR1 F</i></b>	CTATACAGCAAATAGCGAACAGTACGAAAGTAAACATCATATTATCAATAcagctgaagcttcgtacgc
<b><i>TRR1 R</i></b>	GATAAGTATACAAAAATTTGAGTGTATCTATTTTATAATGGAAAATTCATcataggccactagtggatc
<b><i>TRR2 F</i></b>	CATTAAAGGAAGAACGAAACGGACTCCACAGTTTCTAATATAAATAAACAcagctgaagcttcgtacgc
<b><i>TRR2 R</i></b>	TACGTAACACAATCGAACAGTAAAAACAAAATAAACCGGTTTTTTTCAGCcataggccactagtggatc

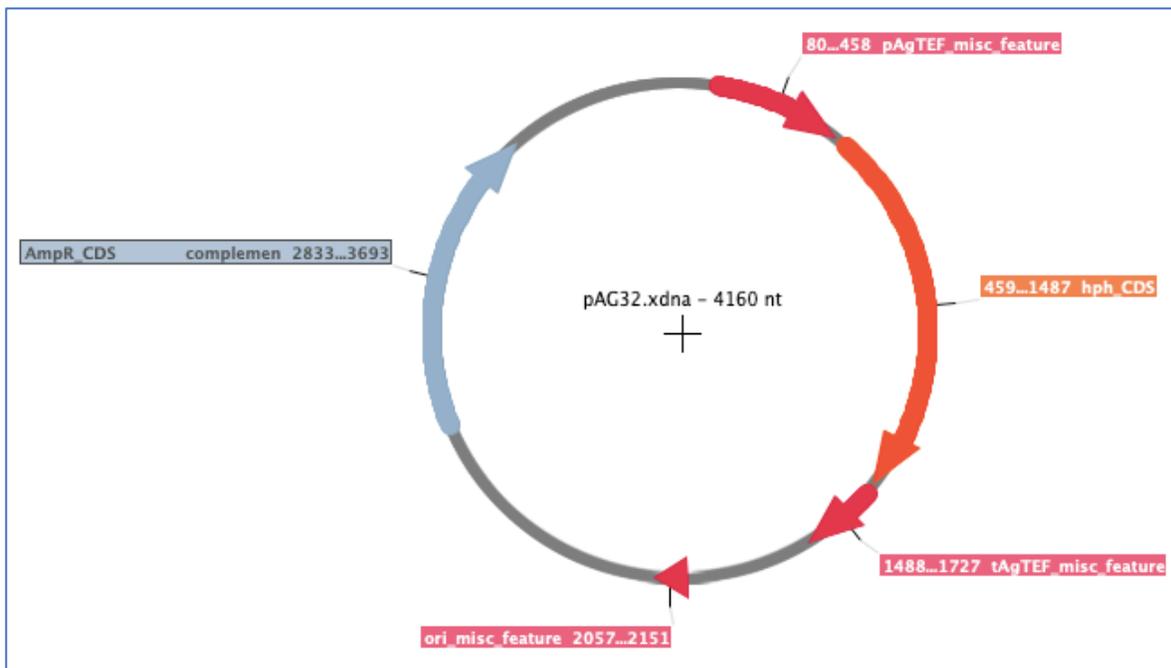
Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos diseñados para la delección de los genes *TRR1* y *TRR2*. \*Los nucleótidos con letras minúsculas pertenecen a la secuencia universal plasmídica.

## PLÁSMIDOS

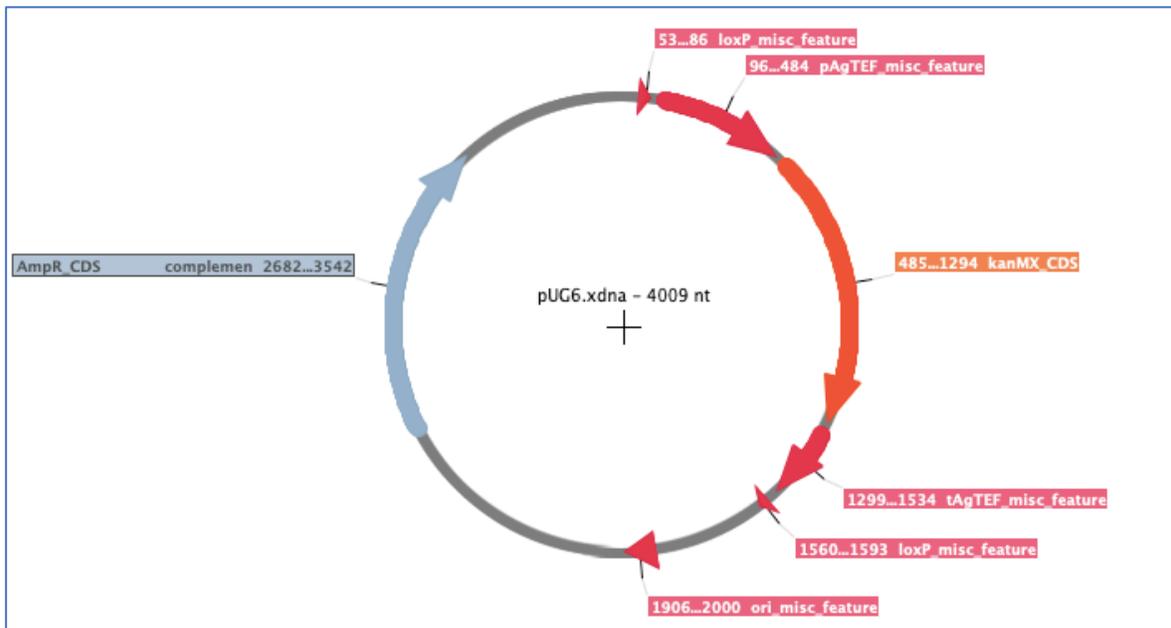
Plásmido	Descripción	Referencia
<b>pAG32</b>	Amp <sup>r</sup> en células de E.coli. Contiene el gen <i>hph</i> de Klebsiella pneumonie que codifica para la higromicina B fosfotransferasa, <i>hygroB</i> <sup>r</sup> para levaduras transformadas.	27
<b>pUG6</b>	Amp <sup>r</sup> en células E. coli. Contiene al gen <i>kanMX</i> de Tn903 que confiere resistencia al antibiótico aminoglicósido G418 <sup>r</sup> para levaduras transformadas.	27

Tabla 3. Características de los plásmidos utilizados para la inserción del casete de resistencia.

## MAPAS DE LOS PLÁSMIDOS



Esquema 1. Plásmido pAG32



Esquema 2. Plásmido pUG6.

## PCR PARA DELECCIÓN: OBTENCIÓN DE MUTANTES SENCILLAS

Reactivo	Volumen
H <sub>2</sub> O	12.4µL
Buffer 5X c/Cl <sub>2</sub> Mg*	4.0µL
dNTP's [10mM]	0.4µL
Templado [1ng/µL]	0.5µL
Oligonucleótido Forward 200mM	1.0µL
Oligonucleótido Reverse 200mM	1.0µL
Phusion High Fidelity DNA polymerase*	0.2µL

\*Reactivos comprados en Thermo Fisher Scientific®.

Condiciones		
Paso	Temperatura	tiempo
Desnaturalización inicial	98°C	30s
Desnaturalización	98°C	10s
Alineamiento	57°C	30s
Extensión	72°C	30s
Extensión final	72°C	10m
Hold	4°C	∞

} 35 ciclos

Los productos de PCR obtenidos se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, tomando 5 $\mu$ L de producto + 1 $\mu$ L de buffer de carga. El gel se corrió a 130mV por 60 minutos, usando como buffer de corrida SB 1x (stock 20x 4g NaOH, 45g Ácido bórico en 1L de H<sub>2</sub>O destilada). Después de incubar 15 minutos con bromuro de etidio 1X se tomó una foto del gel en la Unidad de Biología Molecular del IFC con el fotodocumentador AlphaDigiDoc™.

---

## TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS

Se utilizó el protocolo PEG a partir de células competentes BY4742: se agregaron 100 $\mu$ L de la mezcla (100mMLiAc, 10mM TrisHCl pH8 (de stock 1 M), 1mM EDTA/NaOH pH8, 40% PEG3350) a cada tubo eppendorf (cada uno con 20 $\mu$ L de células competentes), 10 $\mu$ L del producto de PCR. Se dejó una incubación a temperatura ambiente de 30min, se agregaron 10 $\mu$ L de DMSO posteriormente se realizó un choque térmico de 42°C por 15min. Después de una centrifugación breve las células se resuspendieron en 500 $\mu$ L de YPD y se incubaron a 30°C por 4 horas para su recuperación. Pasado el tiempo de recuperación se dio una centrifugación breve y se resuspendieron las células con el sobrante de YPD y se sembraron en YPD+250mg/ $\mu$ L higromicina (pAG32) o bien YPD+200mg/ $\mu$ L G418 (pUG6) incubando 3 días a 30°C.

---

## ELECCIÓN DE COLONIAS “MUTANTES” Y EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

Se eligieron 3 de las colonias más grandes por cada transformación, se tomó una asada para realizar los precultivos con 10mL de YPD+antibiótico incubando 48hr a 30°C, con la finalidad de extraer el DNA genómico y comprobar por PCR. A partir de los precultivos se centrifugó 2 minutos a 3000rpm para la obtención de las

células; se resuspendió el botón de células en 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada y se volvió a centrifugar, se resuspendieron las células en 200 µL de solución QTP (Triton X-100 2%, SDS 1%, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 8, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA) en vortex. Deshecho el botón se adicionaron 0.3 g de perlas de vidrio, 100µL de fenol y 100µL de cloroformo. Los tubos sellados se agitaron por 4 minutos, después se adicionaron 200 µL de buffer TE (100mM Tris-Cl, 10 mM EDTA ph 8) 1X [], a continuación se centrifugan a 3000rpm por 5 min. Se transfiere la fase acuosa a un tubo nuevo adicionado 1 mL de etanol 100%, se mezcla.

## OLIGONUCLEOTIDOS Y PCR PARA CONFIRMACIÓN DE COLONIAS MUTANTES

Oligonucleotido	Secuencia 5'-3'	Descripción
<b>TRR1 A</b>	GGCAGTAAGTGTTCATTC	Oligo A para confirmar inserción río arriba del cassette de resistencia al gen <i>TRR1</i> .
<b>TRR1 D</b>	TAGAGAGTCAATCTGCGTA	Oligo D para confirmar inserción río abajo del cassette de resistencia al gen <i>TRR1</i> .
<b>TRR2 A</b>	CCTCAATCACATCATCCTT	Oligo A para confirmar inserción río arriba del cassette de resistencia al gen <i>TRR2</i> .
<b>TRR2 D</b>	TCACTGACCAAGTCAAAGC	Oligo D para confirmar inserción río abajo del cassette de resistencia al gen <i>TRR2</i> .

Tabla 4. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron tomadas de la base de datos [], los cuales fueron reducidos a 19nt (inicialmente eran de 25nt), la finalidad es comprobar que se haya llevado la recombinación homóloga entre el gen blanco y el producto de PCR inicial. Si se llevó a cabo esta recombinación entonces el gen blanco se habrá deletado y en su lugar estará la secuencia que codifica para el casete de resistencia al antibiótico del plásmido utilizado.

## PCR PARA CONFIRMACIÓN DE MUTANTES

Reactivo	Volumen
H <sub>2</sub> O	19.8 μL
Buffer 10x Dream Taq (20mM MgCl <sub>2</sub> )*	4.0 μL
dNTP's [10mM]	0.5 μL
Templado [1ng/μL]	1 μL
Oligonucleótido A 100mM	0.5 μL
Oligonucleótido D 100mM	0.5 μL
DNA Dream Taq polymerase*	0.2 μL

\*Reactivos de Invitrogen

Condiciones		
Paso	Temperatura	tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min
Desnaturalización	95 °C	30 s
Alineamiento	50 °C	30 s
Extensión	72 °C	1.75 min
Extensión final	72 °C	10 min
Hold	10 °C	∞

} 35 ciclos

Las colonias mutantes únicamente se confirmaron por PCR de confirmación, no se mandó a secuenciar.

## OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES *trr2Δ*

Una vez confirmadas las colonias mutantes *trr2Δ* *hygroB<sup>r</sup>* se dejó un precultivo de YPD (5 mL) + Sorbitol, se dejó creciendo por 24 hrs a 30 °C, después en 50 mL de YPD+S se inoculó a D.O.= 0.1 y se dejó creciendo a 30 °C hasta D.O=0.5. Se recuperaron las células y se lavaron 3 veces con H<sub>2</sub>O estéril a 1500rpm por 3 min. Se resuspendió el botón de células en 10 mL de Competence solution, se centrifugó y se retiró sobrenadante, se resuspendió en 360 μL de competence solution y se agregó 40 μL de esperma de salmón previamente calentado a 98 °C. Se alicuotó en tubos cada uno con 20 μL.

---

## GENERACIÓN DE DOBLES MUTANTES *trr1Δtrr2Δ*

Con las células competentes *trr2Δ* *hygroB<sup>r</sup>*, se llevó a cabo una transformación (descrita previamente) con producto de PCR (con delección en *TRR1* e inserción del cassette de resistencia a G418, es decir se usó pUG6).

---

## EXTRACCIÓN Y MARCAJE DE PROTEÍNAS PERSULFURADAS MEDIANTE EL SWITCH DE BIOTINA MODIFICADO

Con las cepas confirmadas como mutantes se realizó un precultivo con medio YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% dextrosa) + antibiótico a la concentración necesaria por 24hrs a 30°C. Las células se diluyeron a una D.O. de X y se cultivaron hasta que alcanzaron una D.O. de 0.5 para extraer proteína. El pellet se resuspendió en 1mL de buffer HEN (HEPES 250 mM, NaCl 150 mM, 1 mM EDTA, Triton 1%, Deferoxamida 100 μM, Neocupreina 100 μM y PMSF 100 μM); se agregaron 2 medidas de perlas de vidrio (0.3g), llevándose a cabo 5 ciclos: 30s vortex, 30s hielo. Obteniéndose el sobrenadante se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C, al sobrenadante se le adicionaron 50 μL de SDS al 25% (HENS) y 1μL de MMTS 20 mM (para bloquear los grupos tioles libres) incubándose por 20 min a 50°C en un mezclador a 1400rpm. Se precipitaron las proteínas con 2.5 vol. de acetona absoluta (-20°C) centrifugando a 3100 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Después se resuspendió el pellet en acetona al 70% y se centrifugó (se repitió 2 veces este paso). Se resuspendió el pellet en 800 μL de buffer HENS en tubos ámbar y se adicionaron 200 μL de una solución de HPDP-biotina (en DMSO) 4mM; para los controles negativos se usó únicamente DMSO. Se incubaron los tubos en un mezclador por 2 hrs a temperatura ambiente. Las proteínas se precipitaron con acetona absoluta (-20°C) y se resuspendieron en buffer HENS (se repitió 2 veces este paso). Una vez realizado el último lavado el pellet se resuspendió con 50 μL de HENS y las muestras se guardaron a -70°C.

## WESTERN BLOT

### SDS-PAGE, TRANSFERENCIA, REVELADO

Gel	H <sub>2</sub> O	30% Acrilamida/Bis	Buffer	SDS 10% w/v	APS 10%	TEMED
<b>Concentrador 5%</b>	5.7 mL	1.7 mL	Tris-HCl 0.5M, pH 6.8 2.5 mL	0.1 mL	50 µL	10 µL
<b>Separador 12%</b>	3.4 mL	4 mL	Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8 2.5 mL	0.1 mL	50 µL	5 µL

Tabla 5. Volúmenes de los geles concentrador y separador para el SDS-PAGE.

Para la electroforesis del SDS-PAGE se colocaron 20µL de proteína con buffer no reductor (1:1) por carril. Buffer de corrida 1X (25 mM Tris base 190 mM glicina 0.1% SDS, pH 8.3) 1 hora 20 min a 120 V. Se tiñó un gel con azul de coomassie para asegurar la presencia de proteína, el segundo gel se transfirió.

La transferencia se llevó a cabo con membrana de PVDF, en una cámara con buffer de transferencia 1X (25 mM Tris base, 190 mM glicina, 20% metanol, pH 8.3), a 30 V por 12hr a 4°C. Seguido a esto se bloqueó la membrana con una solución de leche al 5% en TBST por 1 hora, después de 3 lavados con TBST de 5 min cada uno se adicionó el anticuerpo primario anti biotina (Jackson) a una concentración 1:1000, dejándolo overnight a 4°C en agitación. Posteriormente se lavó la membrana 3 veces con TBST por 5 min y se dejó incubando con el anticuerpo secundario anti la fracción Fc del anticuerpo primario de biotina (Jackson) a una concentración 1:20000 por 45 min, después de eso se realizaron 3 lavados con TBST para su posterior revelado. El revelado se llevó a cabo con luminol 200 µL y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µL mezclados (ambos de Millipore) con 400 µL de H<sub>2</sub>O.

## RESULTADOS

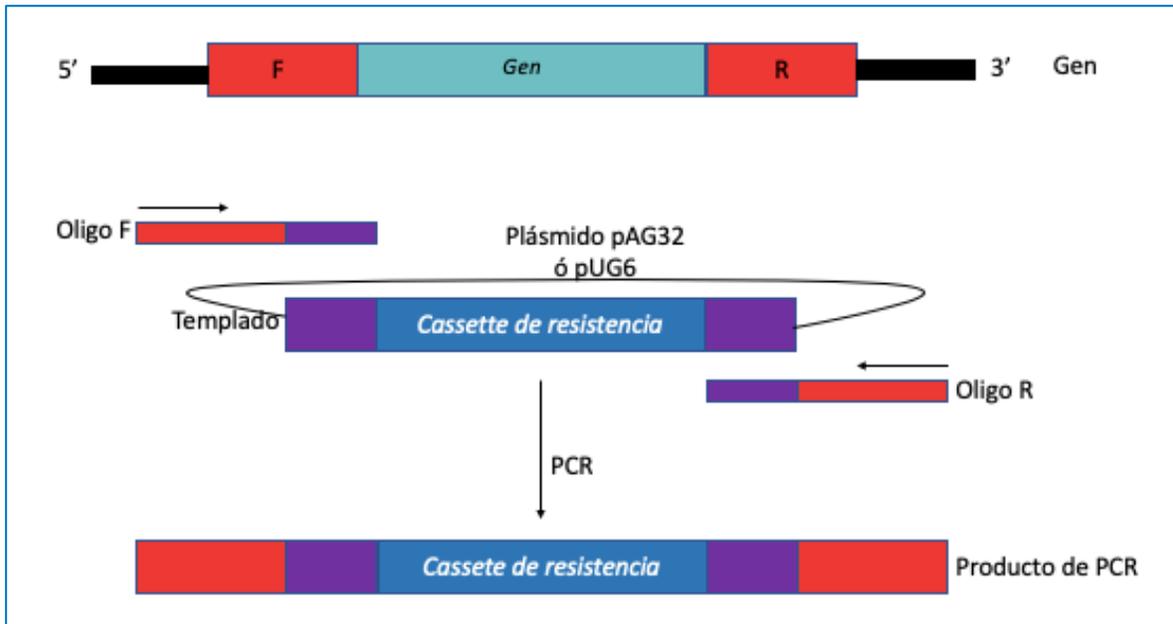
### OBTENCIÓN DE MUTANTES SENCILLAS *trr1Δ* Y *trr2Δ*

Con el fin de obtener mutantes sencillas para los genes *TRR1* y *TRR2*, y así evaluar individualmente el papel que tienen los productos funcionales de estos genes en el nivel de persulfuración en *Saccharomyces cerevisiae* se realizó una PCR con las siguientes características:

Como DNA molde se utilizaron 3 plásmidos por separado, que fueron pAG25 con casete de resistencia al antibiótico CloNat, pAG32 con casete resistencia higromicina y pUG6 con casete de resistencia a G418; oligonucleótidos Forward y Reverse que tienen como particularidad el haberse diseñado de la siguiente manera: en el caso del Forward contiene una secuencia de 50 nucleótidos (Figura 8 recuadro rojo) pertenecientes a la secuencia antes del codón de inicio del gen blanco seguido de 19 nucleótidos pertenecientes a una secuencia universal plasmídica (recuadro púrpura). En cuanto al oligonucleotido Reverse consta de una secuencia antiparalela de 50 nucleótidos posteriores al codón de stop seguido de 19 nucleotidos de una secuencia universal plasmídica.

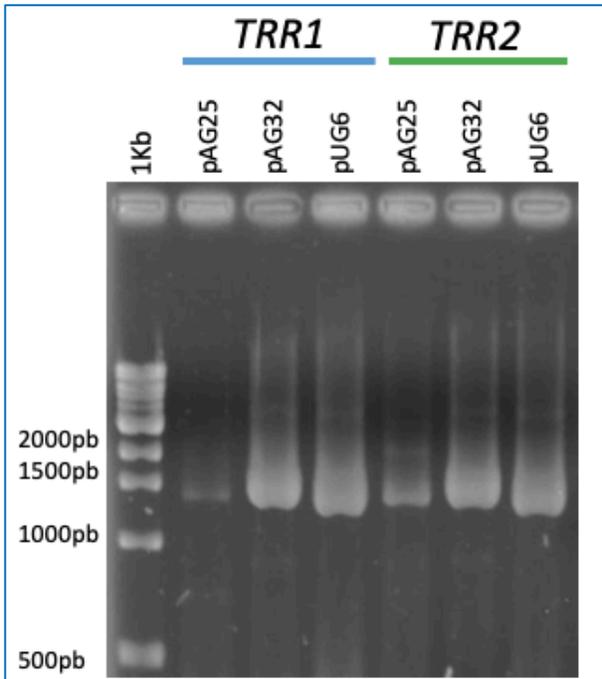
En la figura 8, el Gen (recuadro verde) representa ya sea a *TRR1* o *TRR2*, ya que se siguió la misma estrategia para el diseño de oligos en ambos casos, es así que los recuadros rojos son los 50 nucleótidos antes del codón de inicio (F) y los 50 nucleótidos después del codón de stop de cada gen. La secuencia universal plasmídica está diseñada estratégicamente para que flanquee el casete de resistencia de cualquiera de los 3 plásmidos elegidos. De tal manera que si la PCR resultó exitosa se tendrá un producto que estará compuesto por el casete de resistencia al antibiótico del plásmido flanqueado por los 50 nucleótidos antes del codón de inicio y los 50 nucleótidos después del codón de alto del gen blanco. De este modo los nucleótidos que flanquean al casete de resistencia, al ser homólogos a la secuencia del gen blanco serán los que den pauta para que se lleve a cabo un doble evento de recombinación homóloga y así en lugar de tener el gen que codifica para la tiorredoxina reductasa 1 o 2, según sea el caso,

tendremos un gen que servirá como reportero al darle resistencia a la levadura hacia el antibiótico que codifique.



**Figura 8. Esquema general de la PCR.** Se utilizaron como templados los plásmidos pAG32 y pUG6 de forma independiente. Estos dos plásmidos comparten la secuencia plásmidica de los 19 nucleótidos (recuadro púrpura) y cada uno tiene un distinto casete de resistencia a algún antibiótico: pUG6 G418 y pAG32 kanamicina. El producto de la PCR tiene en los extremos las secuencias homólogas para la inserción en el genoma donde se encuentra el gen de interés, mientras que en medio tiene el casete de resistencia al antibiótico.

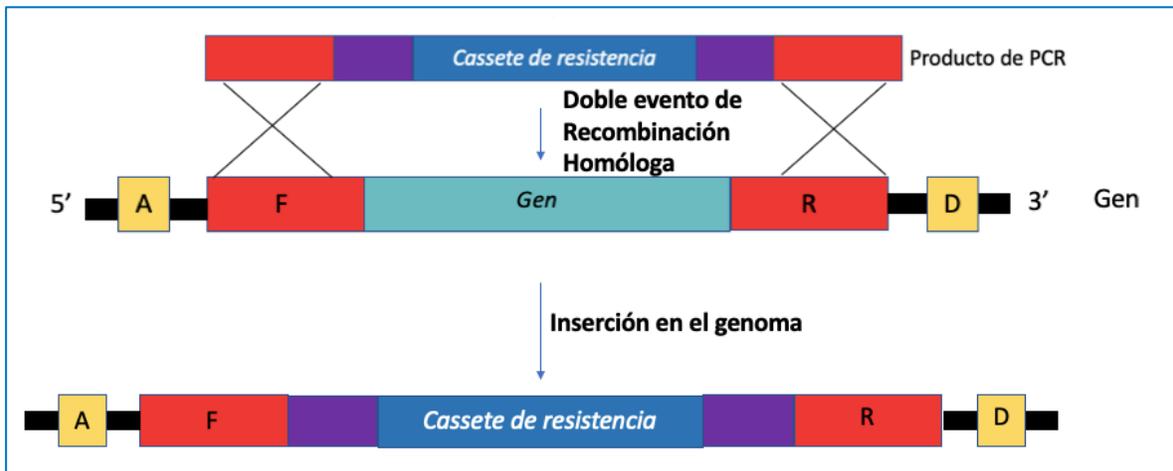
Es así que se realizaron 3 PCR's por gen, para utilizar 2 plásmidos distintos cada uno con un casete de resistencia diferente: pAG32 resistencia a higromicina y pUG6 resistencia a G418. Cada casete con diferente tamaño, por lo tanto las



bandas que se esperan son: pAG32 1863pb y pUG6 1712pb.

Al correr la electroforesis PCR se observó que todas las bandas correspondían a los pesos esperados (Figura 9). Así que el siguiente paso fue transformar levaduras competentes de la cepa BY4742 con cada producto de PCR obtenido y poder crear cepas mutantes para los genes *TRR1* y *TRR2*.

**Figura 9. Electroforesis de los productos de la PCR para obtención de mutantes.** Se muestran los 3 plásmidos que se usaron como templado de manera independiente para los dos genes (*TRR1* y *TRR2*).



**Figura 10. Esquema general de lo que debe suceder para que una célula sea mutante.** Debe ocurrir un doble evento de recombinación homóloga entre las dos secuencias homólogas que flanquean al casete de resistencia en el producto de PCR y las dos secuencias que flanquean al gen que se desea eliminar. Si es exitoso este fenómeno, entonces en lugar del gen tendremos el casete de resistencia al antibiótico.



**Figura 11. Colonias transformadas con el producto de la PCR.** A) Colonias transformadas las cuales podrían tener deletado el gen *TRR1* y ensamblado por recombinación homóloga el producto de PCR que tiene el gen *hph* que confiere resistencia a higromicina. B) Colonias transformadas las cuales podrían tener deletado el gen *TRR2* y ensamblado por recombinación homóloga el producto de PCR que tiene el gen *hph* que confiere resistencia a higromicina.

Dicho lo anterior se transformó con todos los productos amplificados, en seguida se plaqueó en cajas con medio YPD-higromicina (pAG32) y YPD-G418 (pUG6).

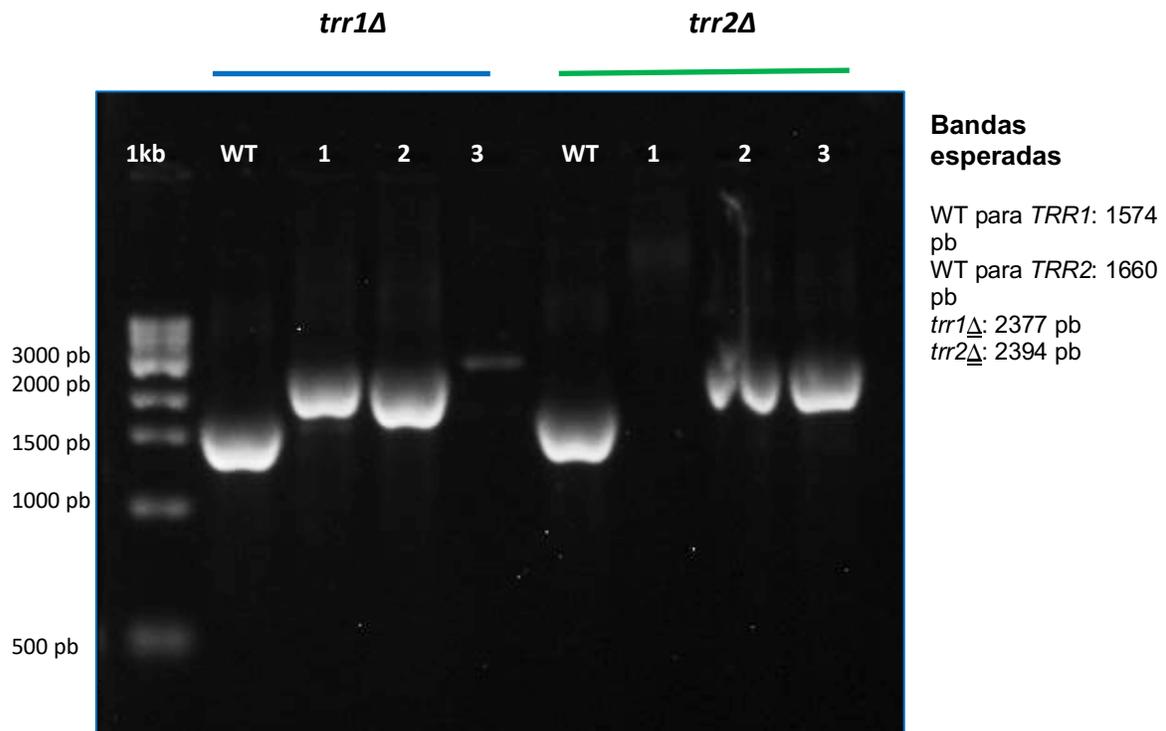
El tener crecimiento de colonias grandes en el medio con antibiótico no asegura el doble evento de recombinación homóloga, no quiere decir que estas sean mutantes, un escenario posible es que por algún error el inserto ocurrió en otro locus del genoma otorgándole la resistencia al antibiótico a la célula y por lo tanto

la mutante para *TRR1* o *TRR2* tampoco existiría. Para saber si en realidad ocurrió se optó por realizar una PCR de confirmación, donde el templado es el DNA extraído de las colonias que creemos son mutantes.

En un principio se eligieron 4 colonias que estuvieran aisladas y grandes para extraer el DNA genómico, pero al final únicamente se extrajo el DNA de 3 colonias por transformación. La finalidad de la extracción del DNA genómico es para utilizarlo como templado en el PCR de confirmación para comprobar si se trata de una mutante o no.

En la figura 10 los recuadros amarillos representan los oligonucleótidos A (del extremo 5') y D (extremo 3'). En el caso del oligonucleótido A es una secuencia de nucleótidos río arriba del gen, está aproximadamente a 200 nucleótidos de distancia del inicio del oligo F; mientras que el oligonucleótido D de igual forma está aproximadamente a la misma distancia del final del oligonucleótido R. Es así que los oligos A y D flanquean las secuencias de los oligos F y R y lo que se encuentre entre estos dos, es decir el gen blanco (*TRR1* o *TRR2* según sea el caso) o el casete de resistencia en caso de ser mutante. En la PCR los oligos A y D se alinearan con las secuencias homologas del DNA de cada colonia.

Entonces si el DNA externo o producto de PCR (DNA que contiene el casete de resistencia) se insertó en el genoma, lo que se amplificó en la PCR tendrá un tamaño y peso distinto al de la cepa WT, debido a que el gen de resistencia al antibiótico del plásmido no tiene el mismo tamaño que el gen original. Por esta razón se siempre se debe comparar con el DNA de la cepa silvestre o Wild Type, para poder observar la diferencia.



**Figura 12.** PCR de confirmación de colonias para corroborar la inserción del gen de resistencia a higromicina (*hph*) al gen *TRR1* o *TRR2* y por lo tanto su delección. Las tres colonias elegidas como mutantes *trr1Δ* son confirmadas; y como mutantes para *trr2Δ* se confirmaron las colonias 2 y 3.

En primera instancia únicamente se comprobaron las colonias que crecieron en medio YPD+higromicina. Las 3 colonias elegidas que posiblemente podrían ser mutantes para *TRR1* se les extrajo el DNA genómico, se hizo la PCR de confirmación con los oligos A y D, la **figura 12** revela que las 3 colonias son confirmadas como mutantes porque las bandas se observan en el peso esperado como mutante (2377 pb) y se encuentran por arriba de la banda correspondiente a la WT (1574 pb) .

Respecto a las probables mutantes *trr2Δ* (Figura 11), las colonias 2 y 3 tienen deletado el gen *TRR2* o en otras palabras son mutantes *trr2Δ*. Las bandas de las colonias 2 y 3 son de 2394 pb por arriba de la banda de la WT con peso 1660 pb. Respecto a la colonia 1, no hubo amplificación posiblemente por falta de DNA genómico o algún error de metodología.

Con el PCR de confirmación demostramos que el doble evento de recombinación homóloga se llevó a cabo en las transformaciones para *TRR1* y *TRR2*, logrando así el primer objetivo de este trabajo: las mutantes sencillas *trr1* $\Delta$  y *trr2* $\Delta$  que tienen como marcador la resistencia a la higromicina. La mutante *trr1* $\Delta$  carecerá de la tiorredoxina reductasa citoplasmática, mientras que la cepa mutante *trr2* $\Delta$  será nula de la tiorredoxina reductasa mitocondrial.

---

### GENERACIÓN DE LA DOBLE MUTANTE *trr1* $\Delta$ *trr2* $\Delta$

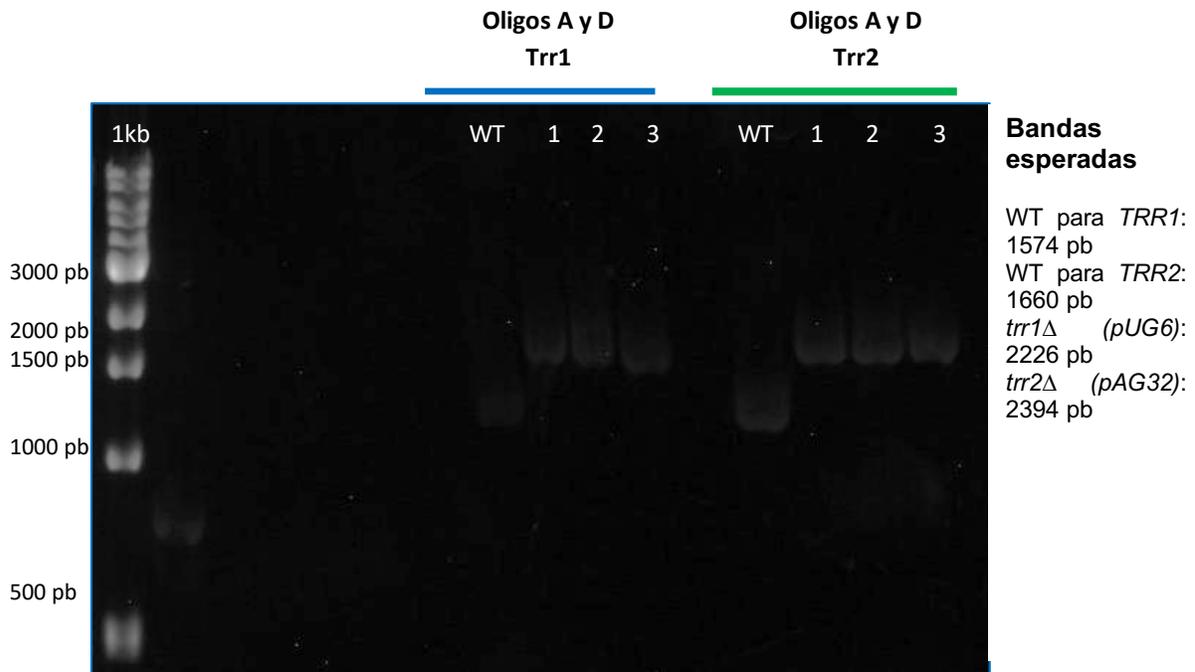
Una vez que logramos generar y confirmar las cepas mutantes *trr1* $\Delta$  y *trr2* $\Delta$ , el siguiente paso fue generar la cepa doble mutante *trr1* $\Delta$ *trr2* $\Delta$ . Esta doble mutante no tendría el sistema tiorredoxina funcional y dependerá de otros sistemas antioxidantes.

Se partió de la cepa *trr2* $\Delta$  (marcador higromicina), la cual pasó por un proceso para obtener células competentes (descrito en materiales y métodos) y se transformaron con un producto de PCR generado con los oligos F y R para *TRR1* usando el plásmido pUG6, de esta manera se intercambiaría el cassette de resistencia *kanMX* por el gen *TRR1* generando así la doble mutante.

Se plaquearon en medio YPD+Higromicina+G418, al ser dobles mutantes tienen cassette de resistencia para higromicina y para G418. Se eligieron 3 colonias grandes y separadas para la extracción de DNA genómico para poder hacer el PCR de confirmación. En este caso el PCR de confirmación se hizo en dos partes:

- 1- Oligos A y D de *TRR1*: Se utilizaron los oligos A y D que flanquean al gen *TRR1*, ya que si es mutante para este gen, entonces tendrá insertado el cassette *kanMX* que es de mayor tamaño que el gen *TRR1*.
- 2- Oligos A y D de *TRR2*: Los oligos de confirmación que flanquean a *TRR2*, por lo tanto si es mutante en lugar del gen *TRR2* tendrá el cassette de resistencia a higromicina.

En ambas partes se usó el mismo DNA genómico de las 3 colonias de manera individual, al igual se comparó con DNA genómico de la cepa silvestre.



**Figura 13. PCR de confirmación para la doble mutante *trr1Δtrr2Δ*.** En las 3 colonias se utilizan oligos de confirmación para *TRR1* y *TRR2*. Resultando las 3 como dobles mutantes *trr1Δtrr2Δ*.

La figura 13 muestra el resultado del PCR de confirmación para las 3 colonias propuestas como dobles mutantes. Podemos observar que las 3 colonias resultaron ser dobles mutantes porque en ambos casos utilizando los oligos de confirmación de *TRR1* y *TRR2*, tenemos bandas correspondientes a mutantes de *TRR1* (2226pb) y mutantes de *TRR2* (2394pb) respectivamente. Es así que la WT con oligos de confirmación de *TRR1* tenemos la banda esperada de 1574 pb y de 1660pb para los oligos de confirmación *TRR2*.

De esta manera generamos nuestra cepa doble mutante *trr1Δtrr2Δ* resistente a higromicina y a G418. Consiguiendo otro de nuestros objetivos.

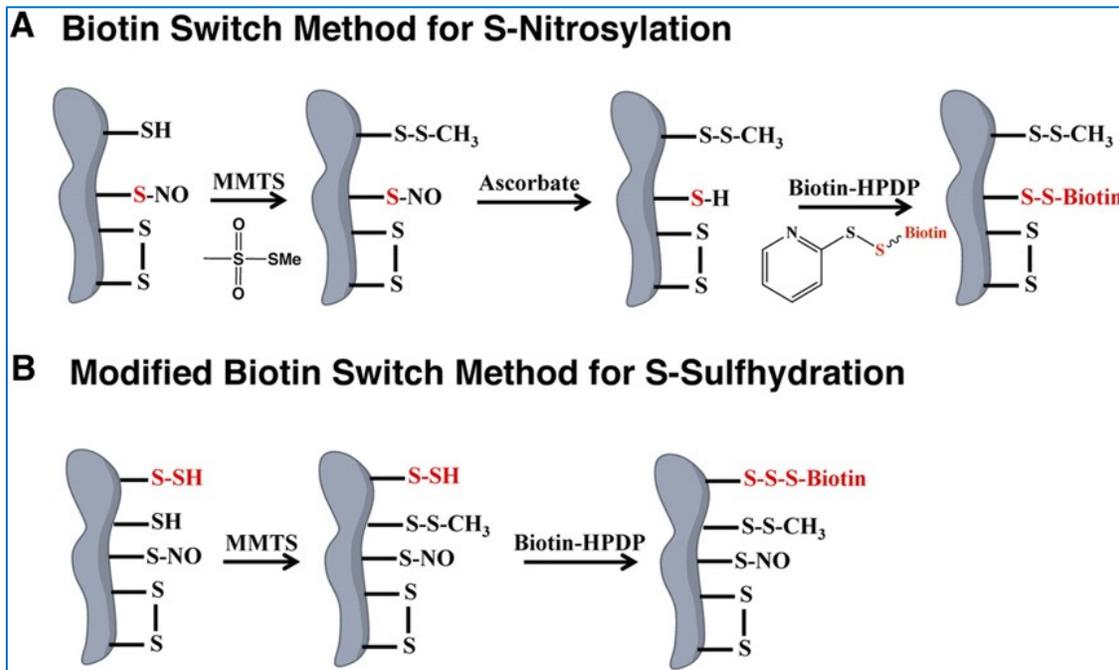
## EVALUACIÓN DEL NIVEL DE PERSULFURACIÓN EN LAS CEPAS MUTANTES GENERADAS

Habiendo generado las cepas mutantes *trr1* $\Delta$ , *trr2* $\Delta$  y la doble mutante *trr1* $\Delta$ *trr2* $\Delta$ , nuestro siguiente objetivo fue evaluar la participación que tienen las tiorredoxinas reductasas de manera individual con las mutantes sencillas en la regulación de la persulfuración, así como evaluar el nivel de persulfuración cuando la célula se encuentra con un sistema tiorredoxina no funcional (cepa doble mutante).

Para esto se extrajo la proteína de las colonias que se habían confirmado (protocolo se encuentra en materiales y métodos) se marcó con HPDP-Biotina, siguiendo la técnica del *switch de Biotina modificado*<sup>1</sup>, técnica utilizada originalmente para detectar proteínas S-nitrosiladas (-SNO), modificación post-traducciona que también tienen como blanco las cisteínas. En la técnica original los grupos tioles (-SH) de la proteína se metilan con MMTS, para después reducir con ascorbato las cisteínas nitrosiladas dando como resultado de la reacción un grupo tiol y así marcarlo con HPDP-Biotina, de esta manera los grupos tioles marcados son las cisteínas que estuvieron anteriormente nitrosiladas (Figura 14A)

El switch de biotina modificado es para detectar persulfuración en proteínas (Figura 13B); también se inicia metilando los grupos tioles (-SH) libres de las proteínas con MMTS, pero los persulfuros (-SSH) no se metilan, quedando intactos para posteriormente ser marcados con HPDP-Biotina. Este método se llama switch de Biotina modificado, porque a diferencia del método para ver nitrosilación, este se realiza sin la presencia de un agente reductor como el ascorbato.

De esta manera nos fue posible marcar aquellas proteínas que estuvieran persulfuradas y así evaluar por medio de un Western Blot, con un anticuerpo anti-biotina, el nivel de persulfuración de cada mutante respecto a la Wild Type.

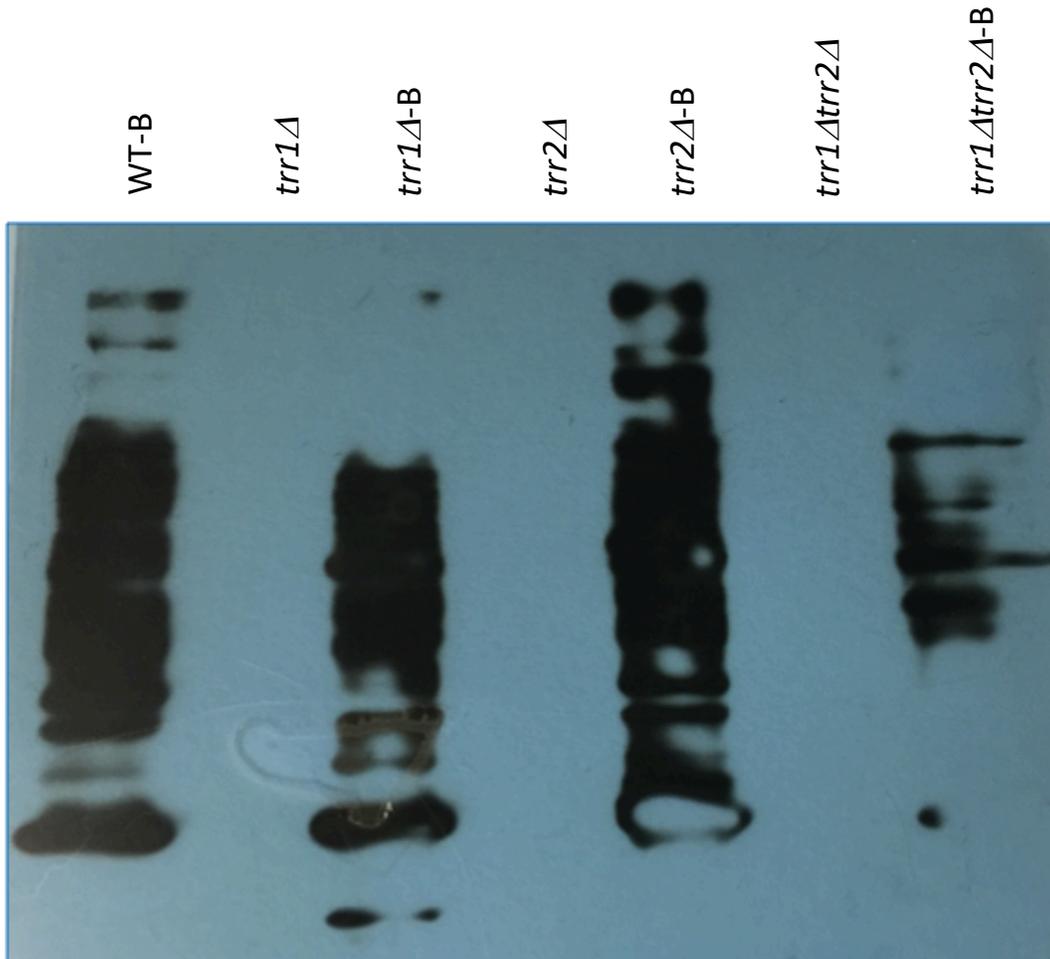


**Figura 14.** A) Método switch de biotina para proteínas S-Nitrosiladas. Los -SH de las proteínas son metilados con MMTS, posteriormente el ascorbato reduce a las proteínas S-nitrosiladas a -SH para poder ser marcadas con HPDP-Biotina. B) Método del switch de biotina modificado. Los -SH son metilados por el MMTS para que únicamente los persulfuros -SSH reaccionen con el HPDP-Biotina y queden marcados. Imagen tomada de *Aroca et al., 2015*

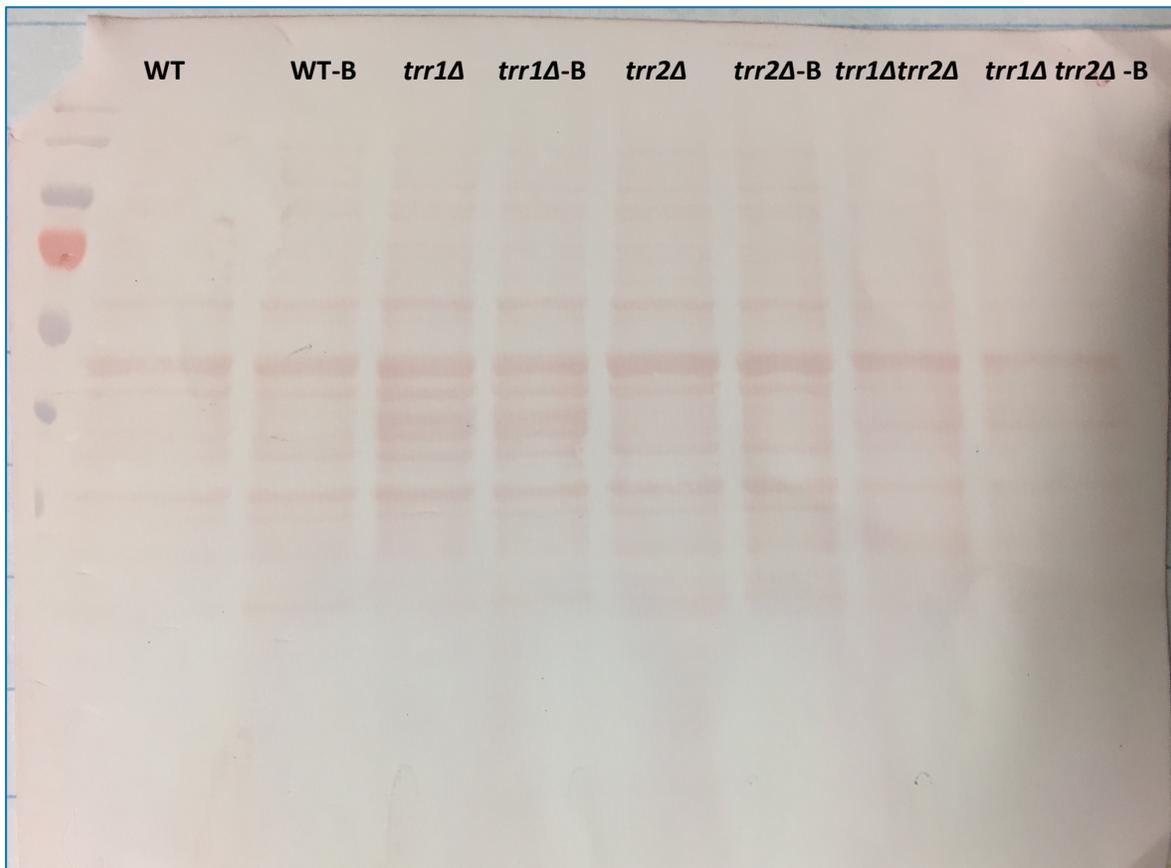
Es así que la proteína extraída de la WT, *trr1Δ*, *trr2Δ* y *trr1Δtrr2Δ* recibieron 2 tratamientos: un grupo marcado con HPDP-Biotina y un grupo control que no fue marcado, con el fin de confirmar que la señal del western blot sea por el marcaje con la biotina. De esta forma observamos que la mutante sencilla *trr1Δ* es la que mostró menor señal correspondiente a menos proteínas persulfuradas respecto a la WT y a la mutante sencilla *trr2Δ*. Este es un resultado inesperado debido a que se pensaba que la WT sería la cepa donde se observaría una menor señal porque en esta el sistema tiorredoxina citoplásmico y mitocondrial serían funcionales, lo que implicaría una menor acumulación de proteínas persulfuradas. Donde se observó la mayor señal fue en la mutante *trr2Δ*, resultado que podría explicarse porque en la mitocondria hay mayor estrés oxidativo y al quitar o dejar disfuncional el sistema tiorredoxina se vería reflejado en un mayor número de proteínas oxidadas (Figura 15).

Sorpresivamente la doble mutante *trr1Δtrr2Δ* fue la cepa que menor señal mostró respectó a las demás. Se considera como sorpresivo porque esta cepa es la que

tiene un sistema tiorredoxinas reductasas no funcional, entonces se esperaría mayor cantidad de proteínas persulfuradas debido a la ausencia de las tiorredoxinas reductasas.



**Figura 15. Western blot de mutantes de tiorredoxinas reductasas.** Las distintas cepas en las que se evaluó el nivel de persulfuración, todas las que tienen “-B” fueron las que se marcaron con HPDP-Biotina; se observa que la cepa *trr2*Δ es donde se encontraron más bandas correspondientes a proteínas persulfuradas, mientras que la cepa doble mutante *trr1*Δ*trr2*Δ fue donde se observó la menor señal para proteínas persulfuradas, en *trr1*Δ hay menor señal que en la WT (se pensaba que sería la cepa donde menor proteínas persulfuradas se encontrarían).



**Figura 16. Membrana PVD revelada con rojo de Ponceau.** Después de llevar a cabo el Western blot se tiñó la membrana para descartar que la pérdida de proteína y por lo tanto tener falsos negativos.

## DISCUSIÓN

Se sabe que las tiorredoxinas en humano funcionan como despersulfuridasas según los estudios de Rudolff Wedmann y Constantin Onderka que realizaron en 2016, observaron que estas proteínas tienen casi la misma afinidad por los puentes disulfuro así como por los persulfuros. De la misma forma se asemeja ese fenómeno en ratones knockout para TrxR1, debido a que se observó un aumento en el nivel de persulfuración (Doká et al. 2016), así como una menor viabilidad en la línea celular HEK293 (también KO para TrxR1).

Sin embargo este fenómeno únicamente ha sido evaluado en mutantes de TrxR1 que es la tiorredoxina reductasa de citoplasma, pero no se ha evaluado en mutantes de la tiorredoxina reductasa de mitocondria (TrxR2) para saber el efecto

que pudieran tener. Por otro lado, en levadura aun no se ha reportado que esta enzima cumpla el mismo papel de despersulfuridasa. Es así que en nuestro modelo de estudio *Saccharomyces cerevisiae* decidimos realizar mutantes sencillas para TRR1 (tiorredoxina reductasa 1 citoplasmática), TRR2 (tiorredoxina reductasa 2 mitocondrial), y la doble mutante *trr1Δtrr2Δ*; y con ellas evaluar si estas enzimas funcionan con el mismo rol de despersulfuridasa.

En este trabajo no se observó el resultado esperado, iniciando con la cepa WT debido a que es la que presenta una mayor señal de proteínas persulfuradas respecto a dos mutantes (*trr1Δ* y *trr1Δtrr2Δ*), en esta cepa silvestre al tener ambos sistemas de tiorredoxina funcionales, se pensaría que habría menos proteínas persulfuradas pero este no fue el caso. Cabe mencionar que las condiciones en las que se realizaron los experimentos fueron en normoxia, nunca se controló la concentración de oxígeno. Entonces no podemos descartar la posibilidad que en condiciones basales *Saccharomyces cerevisiae* o al menos la cepa BY4742 tenga un alto nivel de persulfuración, ya que es algo que nunca se ha evaluado.

Respecto a la cepa mutante *trr1Δ* el nivel de persulfuración es menor respecto a la WT, este resultado nos dice que en *Saccharomyces cerevisiae* la ausencia de Trr1 no incrementa la persulfuración de las proteínas respecto a la WT, como se observó en humano y en ratón. De hecho se podría decir que su ausencia disminuye la persulfuración. Esto podría explicarse porque aún se cuenta con la tiorredoxina reductasa mitocondrial funcional (Trr2), si bien no participa en la reducción de tiorredoxinas de citoplasma, pero se espera que en mitocondria sea el lugar donde mayor especies reactivas de oxígeno exista, por lo tanto el sistema mitocondrial mantiene el balance redox de la célula. Otra opción podría ser que en levadura las tiorredoxinas son las principales donadoras de hidrógenos para la 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfato reductasa (PAPS), entonces en ausencia de Trr1 disminuya la producción de H<sub>2</sub>S endógeno reflejándose en un nivel disminuido de persulfuración.

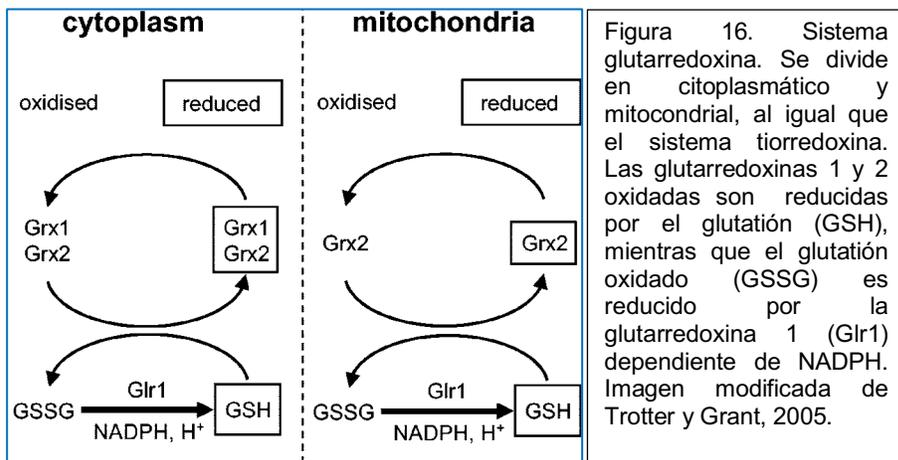
En cuanto a la cepa *trr2Δ* es donde se encuentra un mayor número de bandas y con más intensidad, indicando una mayor persulfuración de proteínas. Esto hace

sentido si recapitulamos que la Trr2 se encuentra en mitocondria junto a Trx3; sabiendo que se llevó a cabo todo en condiciones de normoxia, por lo tanto hay un incremento de especies reactivas de oxígeno o bien de estrés oxidante en mitocondria, entonces en ausencia de Trr2 el sistema de tiorredoxina mitocondrial es disfuncional, es así que no hay sistema que pueda controlar la persulfuración a nivel mitocondrial desencadenando un alto nivel de proteínas persulfuradas. En este caso es posible considerar a la Trr2 como despersulfuridasa.

Otro resultado bastante interesante, si no es que el más sorprendente de este trabajo fue encontrar el menor nivel de persulfuración en la doble mutante *trr1Δtrr2Δ*, resultado totalmente contrario a lo esperado. Al tener ambos sistemas no funcionales, se apostó a creer que esto repercutiría de una manera abrupta en la persulfuración, pero como se muestra en la Figura 15 esto no ocurrió así. Se observa que es la cepa donde la formación de grupos persulfuro fue minúscula, en este caso lo que podría estar ocurriendo en la célula es que otro sistema esté compensando la ausencia de las tiorredoxinas, este sistema puede ser el glutatión-glutarredoxina. Sumado a este resultado, se encontró que la doble mutante tenía menor cantidad de proteína que las mutantes sencillas y la WT (**Figura 16**); esto podría deberse a que al estar ausente el sistema de tiorredoxinas reductasas provoque un estrés redox en el complejo ribosomal alterando la traducción, reflejándose este fenómeno en la disminución de proteína en la membrana de PVD<sup>28</sup>.

El sistema glutatión-glutarredoxina también es un sistema regulador del balance redox celular, pero está mas enfocado a mantener el equilibrio relacionado con las especies reactivas de oxígeno (ROS), aunque también puede reducir los puentes disulfuro; es decir que funciona de manera similar al sistema de tiorredoxina. De igual manera consta de un sistema mitocondrial y uno citoplasmático, en este último las glutarredoxinas 1 y 2 (Grx1 y Grx2) son las que se oxidan y son reducidas por el glutatión (GSH), el glutatión oxidado (GSSG) es a su vez reducido por la glutatión reductasa 1 (Glr1) que es dependiente de NADPH. Mientras que

en mitocondria sucede exactamente lo mismo pero solo se tiene a la Grx2. Ambos sistemas comparten la misma glutatión reductasa.



Dicho lo anterior, en la ausencia de ambos sistemas de tiorredoxina la célula necesita de un sistema que compense esto; aquí es donde el sistema de las glutarredoxinas podría estar sobre activándose, podría fungir como un sistema de apoyo. Y es que se tiene evidencia de la relación que existe entre ambos sistemas, en levadura se tiene reportado que Glr1 puede influenciar el estado redox de Trx3. Mientras que Doká et al. en 2016 demostró en un ratón carente de glutatión reductasa (GR) el aumento en el nivel de persulfuración, magnificándose aun más ese efecto en un ratón KO para GR y TrxR1.

Y retomando que Trr1 pueda estar participando como donadora de hidrógenos para la PAPS reductasa, enzima que forma parte de la asimilación de sulfato inorgánico, fuente principal de H<sub>2</sub>S en levadura; en su ausencia disminuye el nivel de H<sub>2</sub>S de la célula per se; entonces lo que podría estar ocurriendo en esta doble mutante es que el poco H<sub>2</sub>S producido por la célula es fuente para la persulfuración de los residuos de cisteína pero al haber una menor cantidad de H<sub>2</sub>S también habrán menos proteínas persulfuradas; y si no hay Trr2 es aquí donde el sistema de las glutarredoxinas entra como un respaldo para regular el balance redox de la célula pudiendo actuar como despersulfuridasa al igual que las tiorredoxinas.

## CONCLUSIÓN

Se logró generar las mutantes sencillas para las tiorredoxinas reductasas de citoplasma y mitocondria: *trr1Δ* y *trr2Δ* respectivamente; así como la doble mutante *trr1Δtrr2Δ*. Encontramos mediante la técnica de *switch* de biotina modificado que la cepa WT BY4742 per se tiene un alto nivel de proteínas persulfuradas; en cuanto a la mutante sencilla *trr1Δ* el nivel de persulfuración disminuye pudiendo deberse a la participación de Trr1 como donador de hidrógenos de la PAPS reductasa, resultando en un decaimiento en la producción de H<sub>2</sub>S producida, pero con este experimento es imposible determinar si Trr1 tiene un rol de despersulfuridasa. Mientras que en la mutante sencilla *trr2Δ* se observa mayor persulfuración, lo que indicaría un posible papel de despersulfuridasa para Trr2. Respecto a la doble mutante *trr1Δtrr2Δ* la persulfuración se ve muy disminuida siendo la cepa con menor nivel de persulfuración, resultado contradictorio a la hipótesis propuesta; una explicación viable es que al estar ausente Trr1 hay una disminución de producción de H<sub>2</sub>S por lo tanto menos proteínas persulfuradas y por otro lado el sistema de las glutarredoxinas podría estar compensando la ausencia de Trr2 como un sistema de respaldo.

## PERSPECTIVAS

Para poder evaluar si en realidad el papel de la Trr1 es de despersulfuridasa, se propone crecer la cepa *trr1Δ* con una fuente de H<sub>2</sub>S exógena. Ya que si esta participando en la asimilación de sulfato inorgánico entonces su ausencia repercutirá en la cantidad de H<sub>2</sub>S producido. Al poner una fuente exógena de H<sub>2</sub>S, si es que *TRR1* es una despersulfuridasa, en la se esperaría que después del tratamiento se encontrara una acumulación de proteínas persulfuriladas.

Crear cepas mutantes para Trx1, Trx2 y Trx3 para saber el rol que tienen como despersulfuridasas.

Crear cepas mutantes para el sistema glutarredoxina y tiorredoxina, y así poder evaluar si en realidad este sistema funge como respaldo a la ausencia de las tiorredoxinas reductasas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Paul, B. D. & Snyder, S. H. H<sub>2</sub>S: A Novel Gasotransmitter that Signals by Sulfhydration. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 687–700 (2015).
2. Zhang, D., Du, J., Tang, C., Huang, Y. & Jin, H. H<sub>2</sub>S-induced sulfhydration: Biological function and detection methodology. *Front. Pharmacol.* **8**, 1–13 (2017).
3. Nagy, P. & Winterbourn, C. C. Redox chemistry of biological thiols. *Adv. Mol. Toxicol.* **4**, 183–222 (2010).
4. Shibuya, N. *et al.* A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nat. Commun.* **4**, 1366–1367 (2013).
5. Aroca, Á., Serna, A., Gotor, C. & Romero, L. C. S-sulfhydration: A cysteine posttranslational modification in plant systems. *Plant Physiol.* **168**, 334–342 (2015).
6. Kinzurik, M. I., Herbst-Johnstone, M., Gardner, R. C. & Fedrizzi, B. Hydrogen sulfide production during yeast fermentation causes the accumulation of ethanethiol, S-ethyl thioacetate and diethyl disulfide. *Food Chem.* **209**, 341–347 (2016).
7. Paul, B. D. & Snyder, S. H. H<sub>2</sub>S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 499–507 (2012).
8. Knorre, D. G., Kudryashova, N. V. & Godovikova, T. S. Chemical and Functional Aspects of Posttranslational Modification of Proteins. *Acta Naturae* **1**, 29–51 (2009).
9. Alcock, L. J., Perkins, M. V. & Chalker, J. M. Chemical methods for mapping cysteine oxidation. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 231–268 (2018).
10. Nordberg, J. & Arnér, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1287–1312 (2001).

11. Aroca, Á., Serna, A., Gotor, C. & Romero, L. C. S-sulfhydration: A cysteine posttranslational modification in plant systems. *Plant Physiol.* **168**, 334–342 (2015).
12. Li, S. & Yang, G. Hydrogen Sulfide Maintains Mitochondrial DNA Replication via Demethylation of TFAM. *Antioxid. Redox Signal.* **23**, 630–642 (2015).
13. Vandiver, M. S. *et al.* HHS Public Access. (2013) doi:10.1038/ncomms2623.Sulfhydration.
14. Zhao, K., Li, S., Wu, L., Lai, C. & Yang, G. Hydrogen sulfide represses androgen receptor transactivation by targeting at the second zinc finger module. *J. Biol. Chem.* **289**, 20824–20835 (2014).
15. Wang, P. *et al.* Age-Dependent Allergic Asthma Development and Cystathionine Gamma-Lyase Deficiency. *Antioxid. Redox Signal.* **27**, 931–944 (2017).
16. Draculic, T., Dawes, I. W. & Grant, C. M. A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **36**, 1167–1174 (2000).
17. Huang, J. & Zhong, L. Thioredoxin reductase. *Adv. Top. Sci. Technol. China* **8**, 41–64 (2012).
18. Vlamis-Gardikas, A. & Holmgren, A. Thioredoxin and glutaredoxin isoforms. *Methods Enzymol.* **347**, 286–296 (2002).
19. Saitoh, M. *et al.* Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* **17**, 2596–2606 (1998).
20. Hirota, K. *et al.* Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* **274**, 27891–27897 (1999).
21. Zhang, J., Li, X., Han, X., Liu, R. & Fang, J. Targeting the Thioredoxin System for Cancer Therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 794–808 (2017).
22. Muller, E. G. D. Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J. Biol. Chem.* **266**, 9194–9202 (1991).

23. Trotter, E. W. & Grant, C. M. Overlapping Roles of the Cytoplasmic and Mitochondrial Redox Regulatory Systems in the Yeast. *Society* **4**, 392–400 (2005).
24. Wedmann, R. *et al.* Improved tag-switch method reveals that thioredoxin acts as depersulfidase and controls the intracellular levels of protein persulfidation. *Chem. Sci.* **7**, 3414–3426 (2016).
25. Dóka, É. *et al.* A novel persulfide detection method reveals protein persulfide- and polysulfide-reducing functions of thioredoxin and glutathione systems. *Sci. Adv.* **2**, 1–14 (2016).
26. Winston, F., Dollard, C. & Ricupero-Hovasse, S. L. Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast* **11**, 53–55 (1995).
27. Güldener, U. *et al.* <KanMX-loxP.pdf>. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2519–2524 (1996).
28. Activation of translation via reduction by thioredoxin–thioredoxin reductase in *Saccharomyces cerevisiae* | Elsevier Enhanced Reader.  
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0014579309005614?token=DDDDFF9FE1CF631F7DAA067A377B065145D1E5A83C040CC8F9BCF7C39875C7DCABD5CFDBCA91D7A87F9E46F08416188B0>  
doi:10.1016/j.febslet.2009.07.030.