



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PAPEL DE LA PROTEÍNA CISTATIONINA β -SINTASA (CYS4P) EN LA
REGULACIÓN DE LA RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL PLEGADAS
(UPR) EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO
ZOOTECNISTA

PRESENTA
ELÍAS NIETO ZARAGOZA

Asesor:

IBB PhD José Francisco Torres Quiroz.



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.

DEDICATORIA

"Si es cierto que la técnica[...] depende en parte considerable del estado de la ciencia, aún mas depende esta del estado y las necesidades de la técnica. El hecho de que la sociedad sienta una necesidad técnica, estimula más a la ciencia que diez universidades".

F. Engels.

Dedico esta tesis a Cristina y a Walfred. Madre y padre, compañera y compañero de lucha. Gracias por nunca habernos impuesto sus ideologías personales y apoyar el desarrollo de las nuestras. Gracias por lo que nos han enseñado en esta vida, pero sobre todo gracias por su ejemplo. Porque "hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay otros que luchan un año y son mejores. Hay quienes luchan muchos años y son muy buenos. Pero hay los que luchan toda la vida: esos son los imprescindibles". Gracias por ser imprescindibles, y por enseñarnos a serlo.

A Ehecatl y Manuel. Por crecer, por aprender y por equivocarnos juntos. Por corregirme y por escucharme en esta corta vida que llevamos.

A Vanessa. Por aparecer de pronto y llenarlo todo. Por alumbrar mis días mas lúgubres. Por enseñarme y dejarme enseñarte. Por acompañar con amor mis logros y con sabiduría mis errores. Gracias por "la dicha de poder vivir, laborando el comienzo de una historia, sin saber el fin".

Al doc Paco por aceptarme en su laboratorio sin saber una pizca del quehacer científico. Por apoyar mis ideas y nunca poner freno a mi

desarrollo. Por inculcar en mi la curiosidad para seguir intentando decifrar la realidad. Por poner un freno a mi imprudencia con el cariño y el respeto de un verdadero profesor.

A Ana, Ivan, Adrián, Rodrigo, Adri, Carlos y Allison por darme el lujo de ser su amigo y compañero a lo largo de la carrera. Por escuchar mis sinrazones y poner orden en mis ideas. Pero sobre todo, por su cariño.

A mis compañeros y compañeras de laboratorio Bruno, Jesús, Rosario y Damián por compartir sin egoísmo sus conocimientos y hacer mas ameno el trabajo de cada día.

Al doctor Carlos Galina y a la doctora María de Lourdes Juárez, por fomentar en mi el interés científico y en alentarme a seguir buscando las respuestas que busco.

A la clase oprimida de nuestro país, dueña y motivación de mi desarrollo científico. Para ustedes dedico este trabajo y el trabajo de mis manos de ahora en adelante. Por una vida digna y un desarrollo científico verdadero, del lado de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todo el equipo de trabajo del Laboratorio 102-Oriente del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad del desarrollo de este trabajo.

Al doctor Francisco Torres Quiróz y la doctora Paola Moreno Álvarez por su asesoría técnica y teórica.

Al doctor Roberto Coria Ortega y las y los miembros de su laboratorio por el apoyo teórico-práctico, el prestamos de reactivos y cepas de laboratorio.

Al doctor Antonio Peña Diaz y las y los miembros de su laboratorio por las facilidades para el uso del lector de placas.

Al pueblo de México, que financió la presente investigación a través del programa UNAM-PAPIIT IN209219.

Contenido

1	RESUMEN	1
2	Introducción	2
2.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.2	Retículo endoplásmico	3
2.3	Estrés de retículo endoplásmico	4
2.4	Respuesta a Proteínas Mal Plegadas (UPR)	5
2.5	Ácido sulfhídrico (H ₂ S)	9
2.6	Biogénesis del H ₂ S	10
2.7	Modificaciones postraduccionales	12
2.8	S-persulfuración	13
3	Justificación	16
4	Hipótesis	17
5	Objetivos	18
5.1	Objetivo general	18
5.2	Objetivos específicos	18
6	Material y Métodos	19
6.1	Plásmidos, cepas y oligonucleótidos	19
6.2	Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	22
6.2.1	Medios de cultivo de bacterias	22
6.2.2	Medios de cultivo de levaduras	23

6.3	Obtención de células termocompetentes	24
6.4	Transformación de levaduras por choque térmico para la delección de genes	25
6.4.1	Delección del gen <i>HAC1</i>	25
6.4.2	Cepa <i>cys4Δhac1Δ</i>	26
6.5	Confirmación de la delección de genes	26
6.6	Alineación de secuencias de proteínas homólogas	28
6.7	Alineación de las estructuras de proteínas homólogas	28
6.8	Mutagénesis direccionada	29
6.9	Transformación de levaduras por choque térmico con plásmidos	33
6.10	Técnica del goteo	34
6.11	Estandarización de sensibilidad a tunicamicina en medio líquido	35
6.12	Curvas de crecimiento	36
7	Resultados	38
7.1	Delección del gen <i>HAC1</i>	38
7.2	Confirmación de las cepas <i>hac1Δ</i> , <i>cys4Δ</i> , <i>cys4Δhac1Δ</i> y <i>cys3Δ</i>	41
7.3	Sensibilidad de la cepa <i>cys4Δ</i> a estrés de retículo endoplásmico	44
7.4	La acumulación de homocisteína no es responsable de la sensibilidad de la cepa <i>cys4Δ</i> a estrés de retículo endoplásmico	46
7.5	La adición de cisteína cura la sensibilidad de la cepa <i>cys4Δ</i> a estrés de retículo endoplásmico	47
7.6	Las proteínas Cys4p y Cys3p son esenciales para la respuesta a estrés oxidativo	49

7.7	La adición de cisteína recupera el crecimiento de las células durante estrés oxidativo	50
7.8	Interacción genética entre <i>hac1</i> Δ y <i>cys4</i> Δ	52
7.8.1	Concentraciones altas de tunicamicina	53
7.8.2	Concentraciones bajas de tunicamicina	54
7.9	Cisteína cura el fenotipo de sensibilidad en <i>cys4</i> Δ, pero no en <i>hac1</i> Δ ni en <i>cys4</i> Δ <i>hac1</i> Δ	55
7.10	Interacción genética entre los genes <i>CYS4</i> y <i>HAC1</i>	63
7.10.1	Interacción en medio de crecimiento YPD	63
7.10.2	Interacción en medio de crecimiento YPD adicionado con tunicamicina	64
7.11	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos	66
7.12	Análisis de la estructura tridimensional	68
7.13	Mutagénesis direccionada	71
7.14	La mutación en S289D no altera la respuesta a estrés de retículo endoplásmico	75
7.15	La cisteína 301 de Cys4p es importante para la respuesta a estrés de retículo endoplásmico	81
7.16	La cisteína 301 de Cys4p es importante para la respuesta a estrés oxidativo	84
8	Discusión	87
9	Bibliografía	95

1 RESUMEN

NIETO ZARAGOZA ELÍAS. Papel de la proteína cistationina β -sintasa (Cys4p) en la regulación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) en *Saccharomyces cerevisiae* (bajo la dirección de: IBB PhD José Francisco Torres Quiroz).

El retículo endoplásmico es el organelo donde se sintetizan y se modifican proteínas de secreción y de membrana. Durante situaciones de acumulación de proteínas, las células responden activando una vía de señalización conocida como respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Las principales proteínas involucradas son Kar2p, Ire1p y Hac1p. Se ha visto que cuando esta respuesta no funciona adecuadamente las células entran en apoptosis y en eucariotas superiores se asocia con enfermedades neuro degenerativas y crónico degenerativa. Se ha reconocido el papel del ácido sulfhídrico H₂S en estas enfermedades. El H₂S es un gas permeable a las membranas, con la capacidad de modificar la actividad, localización y estructura de las proteínas. Las principales enzimas productoras de H₂S, Cys4p y Cys3p, tienen múltiples actividades, sin embargo la regulación de estas aún está por definirse. Hemos identificado que células mutantes del gen *CYS4* se vuelven sensibles al estrés de retículo. Por lo tanto surge la necesidad de estudiar detalladamente el papel del H₂S producido por Cys4p en la UPR. Se demostró que Cys4p tiene una interacción genética con Hac1p a través de ensayos de goteo y curvas de crecimiento, situación que se exagera en condiciones de ER (estrés de retículo). También demostramos que éste efecto no es dependiente de su actividad catalítica canónica, al mutar la S289 de la proteína. De manera indirecta pudimos determinar que el H₂S producido por Cys4p es esencial para responder al estrés de retículo. Por último, con análisis de estructuras proteicas determinamos posibles blancos del H₂S en las proteínas de la UPR.

2 Introducción

2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, también llamada levadura de pan o levadura de cerveza, ha sido durante décadas un modelo biológico clave para estudiar diversos procesos celulares. La levadura es un eucariota unicelular con características particulares que facilitan la manipulación de su genoma. Tiene una baja complejidad genética, alrededor de 12,000 kb que se reparten en 16 cromosomas y de estas el 72% representan marcos abiertos de lectura (ORF) codificantes a proteínas que, a diferencia de otros organismos eucariotas, es un porcentaje muy elevado y vuelve compacto al genoma. También, menos del 5% de sus ORFs contienen intrones, lo que disminuye la complejidad al haber menos formas resultantes del "splicing" alternativo. A diferencia de otros organismos eucariotas, la levadura únicamente utiliza la recombinación homóloga para integrar ADN transformante. Lo anterior, aunado al hecho de que se puede manipular a las células para tener haploides y diploides, ha contribuido a facilitar las diversas tecnologías de ingeniería genética (1).

Otra de las ventajas de este modelo de estudio es la facilidad con la que se puede trabajar en condiciones experimentales. Una de ellas es la capacidad para generar grandes cantidades de biomasa en tiempos reducidos y a bajo costo. Cepas tradicionales de laboratorio tienen un tiempo de duplicación de alrededor de 90 min en medio de crecimiento YPD (Yeast extract, Peptone, Dextrose) y el crecimiento de colonias completas puede darse en un par de días en cajas de petri utilizando incubadoras ordinarias (2). Asimismo, este microorganismo es uno de los más utilizados en la historia, prueba de esto es que su genoma fue el primer genoma eucariota en ser secuenciado en el año 1996. Gracias a esto, existe una gama de bases de datos y recursos internacionales con información acerca de su genoma, proteóma, técnicas de experimentación, plásmidos, etc (3).

Por otro lado, *Saccharomyces cerevisiae* se ha convertido en uno de los mejores modelos para estudiar el metabolismo y las enfermedades en seres humanos, generadas a partir de la desregulación metabólica. Esto ya que la mayoría de las rutas metabólicas del género humano se encuentran en la levadura y tienen homología de alrededor del 17% de las familias de proteínas (4). Además de la similitud de su proteoma, la levadura es ideal para el estudio de la función y regulación de proteínas ya que naturalmente se llevan a cabo las mismas modificaciones post-traduccionales, a diferencia de las bacterias donde únicamente existen un número limitado de las mismas.

2.2 Retículo endoplásmico

El retículo endoplásmico (ER por sus siglas en inglés) es el compartimiento subcelular más grande de las células eucariotas. El sitio por excelencia de plegamiento y maduración de proteínas de membrana y de secreción, así como algunas citosólicas. Además, cumple algunas funciones metabólicas esenciales de la célula como la síntesis de lípidos y esteroides, metabolismo de carbohidratos y el almacenamiento de calcio (5-7). El ER es una red de membranas dinámicas que conforman una topología compleja de láminas y túbulos, que interactúan con el núcleo y, de forma transitoria, con otros organelos (8). Dentro de esa red membranal se encuentran una serie de enzimas, chaperonas y foldasas que cumplen con las funciones antes mencionadas (8).

Para llevar a cabo la síntesis de proteínas, es necesaria la previa conformación de complejos ARNm:Ribosomas. Los ARNm de las proteínas que se sintetizan en el ER contienen una secuencia consenso de traslocación en su extremo amino terminal. Cuando el ARNm se une a un ribosoma en el citoplasma, se traduce esta secuencia y genera la migración hacia la cara citoplásmica de la membrana del ER. Ahí el complejo ARNm:Ribosoma se une a un receptor específico para la secuencia de traslocación. La cadena polipeptídica nascente entra al lumen del ER a través del complejo de proteínas de canal Sec. Durante o posteriormente a

la entrada de la cadena, la secuencia consenso es cortada por una peptidasa, liberando así la cadena polipeptídica al lumen del organelo (9).

Una vez en el lumen, las cadenas polipeptídicas sufrirán modificaciones post-traduccionales (MPT) que les ayudarán a tomar su configuración proteica tridimensional y/o migrar hacia su destino. Las MPT más relevantes que permiten lo anterior descrito son: la N-glicosilación y la formación de puentes disulfuro. Durante este proceso intervienen foldasas y chaperonas que ayudan al plegamiento de las proteínas y la formación de complejos proteicos. De esta manera, las proteínas son procesadas y enviadas a su lugar de destino. Sin embargo, no todas las proteínas llegarán a adquirir su estructura nativa funcional. Estas proteínas pueden quedarse en el lumen del ER y volver a procesarse o bien, entrar a un proceso de degradación mediado por el complejo proteico proteasoma llamado degradación asociada a retículo endoplásmico (ERADD) (10).

La síntesis de proteínas en el ER es un proceso biológico complejo estrechamente regulado, ya que en caso contrario podrían afectarse las funciones celulares globales. Aún cuando esto no ocurre, las células cuentan con una última vía de regulación: las respuesta a proteínas mal plegadas o UPR.

2.3 Estrés de retículo endoplásmico

Ya que la mayoría de las proteínas de señalización de las células que se utilizan para sensar el medio ambiente se sintetizan en el ER, es vital que cuando salgan del mismo lo hagan con su forma nativa y funcional. De esta manera se genera un equilibrio entre la cantidad de proteínas que se sintetizan y que salen del lumen del retículo. Durante su proceso evolutivo, los organismos eucariotas desarrollaron distintos mecanismos para asegurar que esto ocurra. Como ya se mencionó anteriormente, uno de los mecanismos de protección es la degradación de las proteínas defectuosas a través de ERADD y mantener así el equilibrio . Sin embargo,

hay situaciones donde la carga de proteínas que soporta el retículo endoplásmico sobrepasa las capacidades de procesamiento y degradación. Las proteínas encargadas de ayudar en la modificación y plegamiento se vuelven insuficientes y el ER se satura de proteínas mal plegadas. Debido a esto, se inhibe la capacidad de la célula de sintetizar y procesar proteínas en este organelo. A esto se le conoce como estrés de retículo endoplásmico. Un método para inducir este estrés en condiciones de laboratorio es mediante el uso del antibiótico tunicamicina, que inhibe a las enzimas responsables de la N-glicosilación provocando así la acumulación de proteínas mal plegadas.

Cuando las condiciones que provocan el estrés persisten, las células adoptan una última medida de defensa: Apoptosis. En eucariotas multicelulares, *Homo sapiens* y *Bos taurus* por ejemplo, la incapacidad de resolver el estrés de retículo endoplásmico se ha relacionado con la presencia de enfermedades crónico degenerativas. Por mencionar algunas, se ha demostrado su relación con el desarrollo de diabetes tipo I y II (11-12), de enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis e hipertensión (13), enfermedades metabólicas como el hígado graso (14) y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y de Huntington (15).

Antes de que ocurra lo antes citado, la célula intentará darle soporte al retículo endoplásmico a través de vías de señalización específicas para este dilema fisiológico.

2.4 Respuesta a Proteínas Mal Plegadas (UPR)

El retículo endoplásmico tiene ciertos mecanismos específicos para sensar y actuar ante la acumulación de proteínas mal plegadas, y por ende, del estrés de ER. Este mecanismo se conoce como la respuesta a proteínas mal plegadas o UPR (por sus siglas en inglés). La UPR tiene 3 ramificaciones que adoptan el nombre de su principal proteína sensora: IRE1, PERK y ATF6. De estas tres, la ramificación que se encuentra más conservada entre los organismos eucariotas, y que encontramos en *Saccharomyces cerevisiae*, es la de IRE1, ejemplificada en

la figura 1. La respuesta a estrés de retículo endoplásmico mediada por Ire1p comienza con Kar2p (BiP en organismos metazoa).

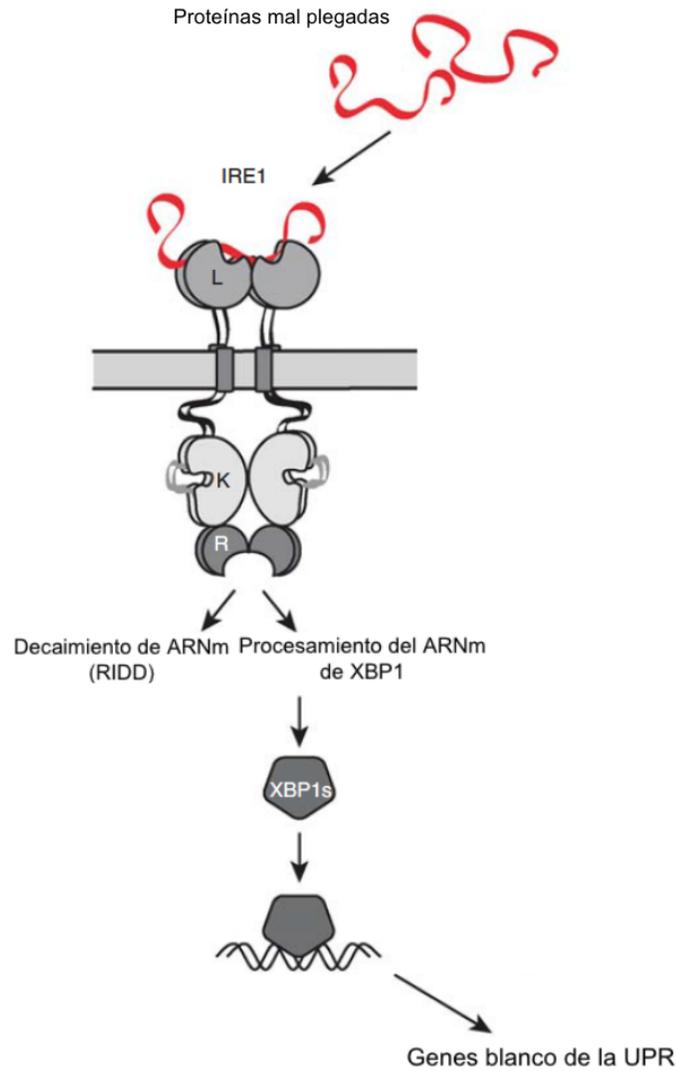


Figura 1. Rama IRE1 de la UPR (modificado de 16). La proteína transmembranal IRE1 reconoce a proteínas mal plegadas en su dominio luminal promoviendo así su oligomerización. Los homodímeros de IRE1 se autofosforilan y con dominio citosólico corta al ARNm del factor de transcripción XBP1 (HAC1 en levadura). XBP1 migra al núcleo y activa la transcripción de genes asociados a la UPR.

Kar2p es una chaperona ATPasa de la familia Hsp70. En estados de no estrés, Kar2p

actúa como cualquier otra chaperona, es decir, ayuda al plegamiento de las proteínas para que estas alcancen su estado nativo. Inicialmente Kar2p se encuentra unida a una proteína transmembranal llamada Ire1p y se libera en presencia de proteínas mal plegadas. Cuando Kar2p tiene en su dominio de unión a nucleótido (NBD) una molécula de ATP puede unir una proteína sub-glicocilada o con residuos de aminoácidos hidrofóbicos, es decir proteínas mal plegadas (17), a su dominio de unión a sustrato (SBD). El SBD regula alostericamente al NBD cuando se une a una secuencia peptídica, promoviendo la hidrólisis del ATP a ADP. Kar2p sufre entonces un cambio conformacional que atrapa a la secuencia peptídica en el SBD, ayudándole así al plegamiento. Estudios recientes han demostrado que la oxidación y modificación del residuo de cisteína en la posición 63 inhibe la liberación de la secuencia peptídica, convirtiéndose en "holdasa"(chaperona que se une a una proteína mal plegada para evitar su agregación, pero no promueve su plegamiento) (18). Se ha visto que esta chaperona también puede dirigir a las proteínas atrapadas en su dominio de unión a sustrato directamente, a su degradación (19). De esta manera la chaperona regula la cantidad de proteínas mal plegadas disponibles en el lumen del retículo endoplásmico.

El principal sensor de estrés y la proteína que le da el nombre a esta ramificación de la UPR es Ire1p. Ire1p es una proteína monomérica transmembranal con actividades de cinasa y ribonucleasa en su dominio citosólico. En su dominio luminal se encuentra unida con Kar2, unión que se rompe cuando la chaperona sensa proteínas mal plegadas. En el momento en que se separa Kar2p, queda libre una ranura en su estructura terciaria que le servirá para reconocer secuencias peptídicas. Posteriormente ocurre un fenómeno interesante que hasta la fecha queda por dilucidar. Una vez liberado Kar2p y unida a la secuencia peptídica, Ire1p se dimeriza con otra molécula de Ire1p con las mismas características y se autofosforila e inicia su actividad de ribonucleasa. La región del dominio citosólico con actividad de ribonucleasa corta al ARNm del factor de transcripción Hac1p iniciando así su splicing alternativo. Este proceso complejo se desencadena a lo largo de toda la membrana del retículo endoplásmico y ocurre una acumulación de oligómeros de alto orden de Ire1p en ciertas regiones de la membrana (20). Aún no se esclarece la forma en la que Ire1p regresa a su forma monomérica, pero queda claro que este proceso es dinámico y que Ire1p regresará a su estado monomérico

incluso si no se resuelve el estrés de retículo endoplásmico. Reportes recientes en *C. elegans* indican que la oxidación y modificación de su residuo de cisteína en la posición 663 inhibe su actividad de autofosforilación, lo que apaga la vía completa (21).

El factor de transcripción que activa Ire1p a través de su actividad de ribonucleasa se llama Hac1p (XBP1 en organismos metazoa).

HAC1 pertenece al reducido grupo de genes de *Saccharomyces cerevisiae* que cuenta con intrones. El gen consta de 2 exones con 1 intrón en medio de ambos, sin embargo el "splicing" no ocurre durante la transcripción del gen, como sucede en la mayoría de los casos, si no que este ocurre a nivel de su traducción a proteína. El ARNm se transcribe normalmente y cuando el ribosoma se une a su región UTR 5' se arresta el proceso de traducción. Este arresto ocurre ya que el apareamiento de bases del intrón genera una estructura secundaria del pre-ARNm, lo que evita que se pueda llevar a cabo la traducción correctamente. También, en la región 3' se encuentra una señal específica de transporte a los oligómeros de Ire1p. Cuando el pre-ARNm de Hac1 se une a la membrana del retículo endoplásmico, la región ribonucleasa del dominio luminal de Ire1p corta el intrón y libera ambos exones, los cuales serán unidos con ayuda de la ligasa de ARNt Trl1p (22). Una vez que tenemos el ARNm final se traduce el factor transcripcional de la familia bZIP Hac1p.

Al ser un factor de transcripción, Hac1p cuenta con el arreglo de aminoácido de transporte a núcleo RKRAKTK (23). Por ende, Hac1p migra al núcleo y activa la transcripción de genes que tienen una secuencia de 22 pares de bases en sus promotores conocida como elementos de respuesta a proteínas mal plegadas o UPRE (por sus siglas en inglés). El factor de transcripción se ancla a la secuencia de ADN y recluta la maquinaria de transcripción para procesar a estos genes. Los productos de esta vía de señalización serán proteínas que ayuden a resolver el estrés de retículo endoplásmico, entre los cuales están: las chaperonas Kar2p, Fkb2p y Lhs1p, la proteína que genera los puentes disulfuro en las proteínas de ER Pdi1p, entre otras (24).

La UPR es una de las vías de señalización estudiadas y más complejas en las células eucariotas, por ende está sujeta a regulaciones finas en cada uno de los puntos claves, como

aquí se describió. En resumen, cuando la célula sufre de estrés de retículo endoplásmico responde a través de la UPR generando más proteínas que ayudan al plegamiento de proteínas, aumentando la síntesis de lípidos para aumentar el espacio del lumen del ER, inhibiendo la llegada de nuevos ARNm al retículo endoplásmico y aumentando la capacidad de degradación de proteínas. Adicionalmente, recientemente se ha descubierto el papel de ciertas moléculas, como el gasotransmisor H_2S , en la regulación del estrés de retículo endoplásmico, sin embargo aún queda por elucidar su papel en este proceso celular.

2.5 Ácido sulfhídrico (H_2S)

El ácido sulfhídrico o H_2S es un gas que está estrechamente correlacionado con el origen de la vida en la Tierra. Esta molécula fue encontrada en remanentes del experimento original de Miller de 1958 y se ha propuesto que era uno de los principales elementos de la atmósfera reductora primigenia al ser emanado de la gran actividad volcánica de la época (25). Producto de lo anterior, los organismos LUCA (Acentro común universal de todos los organismos), y la vida que de ellos descende, tuvieron que haber tenido adaptaciones para sobrevivir en un ambiente rico en este gas. El H_2S es un gas volátil, incoloro, soluble en agua, con olor característico a huevo podrido y tóxico en altas concentraciones. Existen reportes desde el siglo XVII acerca de la toxicidad de este gas, empero fue hace poco que se descubrió que se une e inhibe irreversiblemente al complejo IV de la cadena de transporte de electrones lo que impide la producción de ATP de las células (26).

A finales de los 90's, la investigación de este gas tomó un giro que definiría el futuro de su estudio. El H_2S es un gasotransmisor, o al menos así se planteó cuando se reveló que su producción endógena genera la vasodilatación de vasos sanguíneos periféricos (27). A partir de ahí ocurrió un aumento en los estudios y descubrimientos científicos que exhibieron el papel del H_2S en una gama de procesos biológicos como, por mencionar algunos de

importancia médica, neuromodulador (28), cardioprotector (29), participa en la maduración de ovocitos (30) y promueve la longevidad (31), además se asocian defectos en su metabolismo con enfermedades como la diabetes (32), enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (33), varios tipos de cáncer (34) e hígado graso, mismas que se relacionan con el estrés de retículo endoplásmico.

A pesar de las implicaciones que tiene el H₂S en organismos metazoa, aún existen grandes vacíos en el conocimiento del mismo. Principalmente aún queda mucho que investigar acerca de como el ácido sulfhídrico regula los procesos antes mencionados y como se regula su producción a partir de las enzimas que lo sintetizan.

2.6 Biogénesis del H₂S

En organismos metazoa, el H₂S se sintetiza a través de 3 enzimas que se encuentran conservadas a lo largo de los dominios biológicos: Cys4p, Cys3p y Tum1. Estas proteínas participan en el metabolismo del aminoácido cisteína, ya sea en el catabolismo o el anabolismo de la misma. En el primer caso, la enzima que transforma a 3-mercaptopiruvato, derivado de la deaminación de la cisteína, en piruvato es MST (Tum1p en levadura), liberando H₂S. El anabolismo de la cisteína ocurre a través de la Vía de la Trans-sulfuración inversa. Esta vía metabólica comienza con la homocisteína, un aminoácido no proteogénico que se obtiene a partir de la metionina. En la primera fase de esta vía la homocisteína será transformada en cistationina por la enzima cistationina β -sintasa (Cys4p), a partir de serina. Posteriormente la enzima cistationina γ -liasa transforma la cistationina en cisteína. Tanto Cys4p como Cys3p son proteínas globulares que pertenecen a la familia de Plegamiento tipo II de las proteínas PLP dependientes, o sea utilizan el piridoxal 5-fosfato como cofactor. A partir de este punto, la vía produce la molécula reductora por excelencia en la célula: Glutatión. Sin embargo, cuando las enzimas de la Vía de la Transulfuración tienen su actividad catalítica canónica no se produce H₂S (35). Interesantemente, Cys4p y Cys3p son enzimas con múltiples actividades

catalíticas.

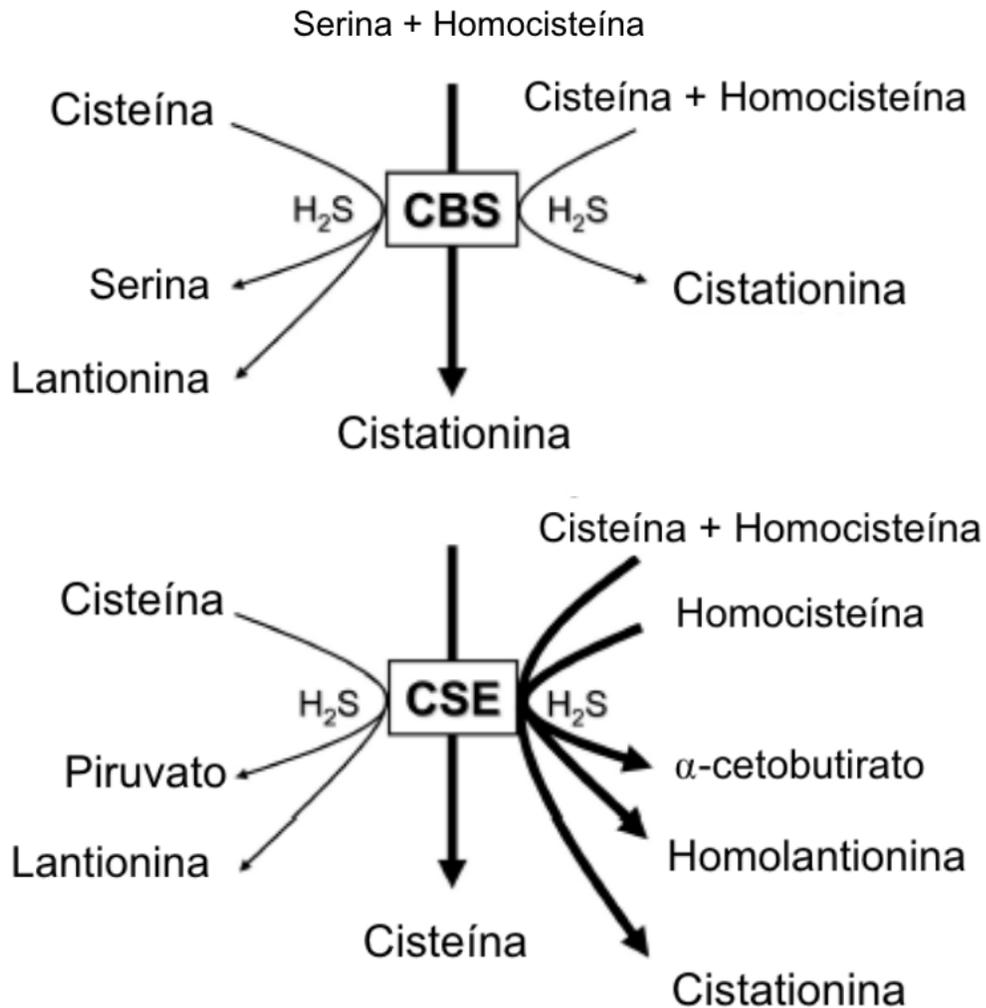


Figura 2. Múltiples actividades catalíticas de CBS (Cys4p) y CSE (Cys3p) (modificado de 35). Las proteínas Cys4p y Cys3p tienen actividades canónicas para transformar la homocisteína es cisteína, si embargo también tienen actividades alternas que tienen como resultado la producción de H₂S.

Como se puede observar en la figura 2, las actividades catalíticas alternas de Cys4p y Cys3p son en las que se produce el H₂S. Por ejemplo, cuando Cys4p interactúa con cisteína en lugar de sus sustratos canónicos homocisteína + serina, se producirá serina y H₂S. Los mecanismos regulatorios por los que estas enzimas mantienen una u otra actividad

catalítica aún quedan por ser descifrados. Tradicionalmente se ha dicho que la principal regulación ocurre a nivel de la concentración de sustrato, esto es que la proteína aceptará a un sustrato cuando este se encuentre en mayor medida que los demás, sin embargo este tipo de razonamiento se ha puesto en duda en distintas ocasiones. Existen múltiples reportes que sugieren cambios en la actividad de Cys4p: 1) la glutationilación del residuo de cisteína en la posición 346 de la proteína de humano aumenta de 2 a 3 veces la actividad canónica de Cys4p (36) 2), la fosforilación de la serina 227 de la proteína de humano promueve la producción de H₂S hasta dos veces (37), y 3) la sumoilación de su residuo de lisina 211 disminuye su actividad hasta en un 70% y promueve su traslocación al núcleo (38). Por lo anterior surge la necesidad de profundizar en la regulación de las enzimas que producen el H₂S. Interesantemente, en levadura únicamente Cys4p y no Cys3p, cuenta con una cisteína dentro de su estructura. Dicha cisteína (C301) podría funcionar como un sensor redox que ayude a la regulación de su actividad. Una cuestión que ha ido adquiriendo importancia en la última década es el mecanismo por el cual el H₂S actúa sobre las proteínas. Todavía hay controversia al respecto, pero se cree que la principal forma de actuar del H₂S es la modificación de residuos de cisteína a través de la S-persulfuración.

2.7 Modificaciones postraduccionales

Los organismos han desarrollado a lo largo de su historia evolutiva estrategias para reconocer y reaccionar ante estímulos del medio ambiente. De estas adaptaciones, las modificaciones post-traduccionales (MPT) son las más importantes. Reflejo de lo anterior es que aproximadamente el 5% del proteoma total de los organismos se encargan de la regulación de estas modificaciones. Las MPT son los cambios químicos que sufre una proteína posteriormente a su traducción. Estas modificaciones sirven para regular la estructura tridimensional, localización subcelular, interacciones proteína-proteína y la actividad de las proteínas que las sufren. La respuesta celular que ofrece este nivel de regulación es mucho más rápido y eficiente que otro, mientras

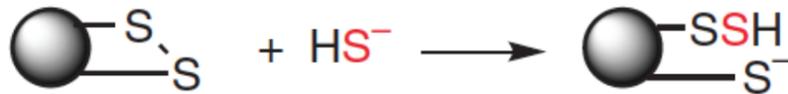
que las vías de transducción pueden llegar a tardar de minutos a horas, las MPT como la fosforilación o la oxidación tardan segundos. De esta manera la célula tiene un sistema de respuesta a presiones medioambientales y logra aumentar la complejidad de su proteoma hasta en un orden de magnitud (39). Recientemente, con la innovación en las técnicas de estudio han ido adquiriendo importancia las modificaciones post-traduccionales en residuos de cisteína.

La cisteína es uno de los dos aminoácidos azufrados proteínogénicos y uno de los que menos frecuentemente aparece en las proteínas. Dada la naturaleza nucleofílica de su grupo tiol ($-SH$) en estado libre, es susceptible a ser modificado por MPTs oxidantes (40). Dentro de las modificaciones que puede sufrir el grupo tiol de los residuos de cisteína encontramos la formación de puentes disulfuro ($R-S-S-R$), la oxidación a partir de especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generando residuos S-sulfenilados ($-SOH$), S-sulfinilado ($-SO_2H$) y S-sulfonilados ($-SO_3H$), y también encontramos las generadas a partir de gases como el H_2S llamadas S-persulfuración ($-SSH$) (41). Como aquí anteriormente se describió, el mecanismo de regulación mediante H_2S aún queda por dilucidar, pero uno de sus principales mecanismos de acción es la modificación de proteínas a través de la S-persulfuración.

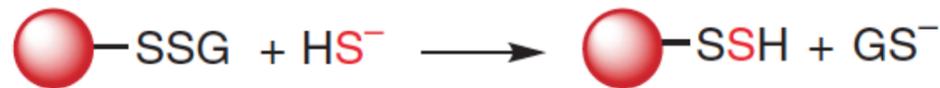
2.8 S-persulfuración

La S-persulfuración de los residuos de cisteína lleva a la modificación de un grupo tiol libre ($-SH$) en uno persulfuro ($-SSH$) por la interacción con H_2S . Sin embargo, en la mayoría de los casos, esta modificación no puede darse de manera espontánea, es decir, el ácido sulfhídrico no puede interactuar con los grupos tioles en condiciones fisiológicas reductoras. Por lo tanto, se ha propuesto que para que ocurra esta interacción la cisteína se debe encontrar previamente oxidada, ya sea formando puentes disulfuro, que se encuentre S-sulfenilada o que se encuentre en alguna otra forma oxidada, como se muestra en la figura 2.

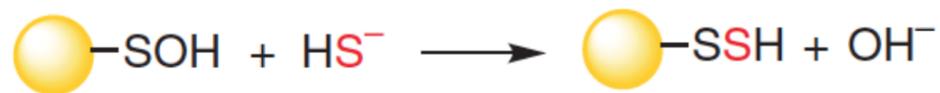
S-persulfuración en tioles oxidados



Puentes disulfuro



Cisteína glutationilada



S-sulfenilación



S-nitrosilación

Figura 2. S-persulfuración en proteínas previamente oxidadas (modificado de 42). La S-persulfuración a través de la forma ionizada del H_2S no puede ocurrir sobre grupos tiol reducidos, por lo que tiene efecto sobre residuos previamente modificados.

Aunque lo anterior queda aún por esclarecerse, lo que si es seguro son los efectos de la S-persulfuración sobre algunas proteínas y vías de transducción, a continuación algunos ejemplos. La S-persulfuración del residuo de cisteína 46 en el canal de potasio ATP-dependiente promueve su apertura, el flujo de potasio en células de músculo liso y por ende la relajación del tejido muscular (43). La enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es esencial para el metabolismo central de las células y se ha reportado que la S-persulfuración reactiva la actividad catalítica perdida durante condiciones oxidantes (44). La S-persulfuración en la cinasa $\text{GSK3}\beta$ inhibe la sobre fosforilación de tau, lo que promueve mecanismos de neuroprotección contra la enfermedad de Alzheimer (45).

Además de los efectos particulares sobre proteínas específicas, se ha descrito a la S-persulfuración como un mecanismo generalizado de protección ante una gama de respuestas fisiológicas. Uno de ellos es la protección a las proteínas de sufrir oxidación irreversible bajo estrés oxidativo (46). Sin embargo, aún existe incertidumbre en el papel que tiene esta MPT en otros procesos celulares complejos como lo es la respuesta a proteínas mal plegadas.

3 Justificación

El retículo endoplásmico es un organelo clave para la función y adaptabilidad de la célula a su medio ambiente. Reflejo de ello son todos los puntos de regulación a través de la UPR para que el organismo se sobreponga al estrés de retículo endoplásmico. Interesantemente, muchas de las enfermedades que están asociadas a la incorrecta respuesta al estrés de retículo endoplásmico se comparten con una defetiosa regulación del metabolismo del H₂S. Estas enfermedades tienen un alto impacto sobre el sistema de salud público de la nación, ya que las enfermedades crónico degenerativas aquí descritas como el cáncer, diabetes, enfermedades hepáticas y neuro vasculares se encuentran todas ellas en las diez principales causas de mortalidad. Por otro lado, existen reportes de que estos dos fenómenos fisiológicos podrían tener impactos en el rendimiento de la producción animal y en cultivos de importancia nacional. Por ende, surge la necesidad de estudiar la interrelación de estos procesos complejos para obtener información y, en un futuro, ayudar a estas problemáticas de México.

4 Hipótesis

La producción de H₂S a partir de la actividad catalítica no canónica de la proteína Cys4p es necesaria para que se lleve a cabo la correcta respuesta a proteínas mal plegadas durante estrés de retículo endoplásmico.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar la participación del H₂S producido por Cys4p en la regulación de la respuesta a proteínas mal plegadas durante estrés de retículo endoplásmico.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar por análisis semi cuantitativos el efecto del estrés de retículo endoplásmico sobre la cepa mutante *cys4Δ* que carece de la proteína Cys4p.
- Analizar el papel de los metabolitos de la Vía de la transulfuración en la respuesta a estrés endoplásmico.
- Evaluar el papel de la actividad canónica de Cys4p mediante la mutación de residuos importantes para que se lleve a cabo.
- Identificar si la cisteína 301 de Cys4p podría estar actuando como un sensor redox.
- Evaluar si existe una interacción genética entre Cys4p y Hac1p para definir si existe una relación con la UPR.

6 Material y Métodos

6.1 Plásmidos, cepas y oligonucleótidos

Las cepas, plásmidos y oligonucleótidos que se utilizaron en el transcurso de la investigación se agrupan en las tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Plásmidos utilizados en este estudio.

Plásmido	Descripción	Referencia
pAG25	Amp ^r para <i>E. coli</i> , contiene el gen NAT1 que codifica para nourseotricina N-acetil-transferasa, marcador de selección ClonNat ^r para levaduras transformadas	47
pAG32	Amp ^r para <i>E. coli</i> , contiene el gen hphMX4 que codifica para higromicina B, marcador de selección Higromicina ^r para levaduras transformadas	47
pRS416	Plásmido monocopia con marcador de selección URA3 para levaduras transformadas. Amp ^r para células de <i>E. coli</i> .	47
pRM06	Construcción de plásmido pRM06, ligación de <i>CYS4</i> (Gen completo) y el vector pRS416. Amp ^r para células de <i>E. coli</i> . URA3 para levaduras transformadas.	48
pRM08	Construcción de plásmido pRM08, ligación de <i>CYS4</i> (sin extremo carboxilo terminal) y el vector pRS416. Amp ^r para células de <i>E. coli</i> . URA3 para levaduras transformadas.	48
C4S289D	Construcción del plásmido C4S289D, mutación direccionada de <i>CYS4</i> causando la sustitución de la serina 289 por aspartato en el plásmido pRM06. Amp ^r para células de <i>E. coli</i> . URA3 para levaduras transformadas.	Este trabajo
C4C301S	Construcción del plásmido C4C301S, mutación direccionada de <i>CYS4</i> causando la sustitución de la cisteína 301 por serina en el plásmido pRM06. Amp ^r para células de <i>E. coli</i> . URA3 para levaduras transformadas.	Este trabajo
C4C301Y	Construcción del plásmido C4C301Y, mutación direccionada de <i>CYS4</i> causando la sustitución de la cisteína 301 por tirosin en el plásmido pRM06. Amp ^r para células de <i>E. coli</i> . URA3 para levaduras transformadas.	Este trabajo

Tabla 2. Cepas utilizadas en este estudio.

Cepas	Genotipo	Referencia
Levaduras		
BY4742	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, ura3 Δ 0	47
<i>cys4</i> Δ	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, ura3 Δ 0, <i>cys4</i> Δ ::ClonNAt	-
<i>cys3</i> Δ	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, ura3 Δ 0, <i>cys3</i> Δ ::ClonNAt	-
<i>hac1</i> Δ	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, ura3 Δ 0, <i>hac1</i> Δ ::Higromicina	Este trabajo
<i>cys4</i> Δ <i>hac1</i> Δ	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, ura3 Δ 0, <i>hac1</i> Δ ::Higromicina, <i>cys4</i> Δ ::ClonNAt	Este trabajo
RPMV002	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, ura3 Δ 0, <i>cys4</i> Δ ::ClonNAt, pRS416::URA3	48
RPMV003	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, ura3 Δ 0, <i>cys4</i> Δ ::ClonNAt, pRM07::URA3	48
RPMV004	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, ura3 Δ 0, <i>cys4</i> Δ ::ClonNAt, pRM08::URA3	48
RPMV005	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, ura3 Δ 0, <i>cys4</i> Δ ::ClonNAt, pRM011::URA3	48
<i>CYS4</i> S289D	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, ura3 Δ 0, <i>cys4</i> Δ ::ClonNAt, C4S289D::URA3	Este trabajo
<i>CYS4</i> C301S	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, ura3 Δ 0, <i>cys4</i> Δ ::ClonNAt, C4C301S::URA3	Este trabajo
<i>CYS4</i> C301Y	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, ura3 Δ 0, <i>cys4</i> Δ ::ClonNAt, C4C301Y::URA3	Este trabajo
ENZ001	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, ura3 Δ 0, <i>hac1</i> Δ ::Higromicina, pRS416::URA3	Este trabajo
ENZ002	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, ura3 Δ 0, <i>cys4</i> Δ ::ClonNAt, <i>hac1</i> Δ ::higromicina, pRS416::URA3	Este trabajo
Bacterias		
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F-80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17(rk-,mk+) phoAsupE44-thi-1 gyrA96 relA1	

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio para la generación y confirmación de cepas.

Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	Descripción
S289DF	[Phos]TTGGTGGGTGGTGATTCC GGTTCTGCCTT	Oligonucleótido sentido para la mutación de S289D en el gen <i>CYS4</i>
S289DR	[Phos]GACACCTTCGTTAGAAAT	Oligonucleótido antisentido para la mutación de S289D en el gen <i>CYS4</i>
CYS4C301S	[Phos]GTTGTGAAATACAGCGAA GACCACCCTGAACTG	Oligonucleótido sentido para la mutación de C301S en el gen <i>CYS4</i>
CYS4C301Y	[Phos]GTTGTGAAATACTATGAA GACCACCCTGAACTG	Oligonucleótido sentido para la mutación de C301Y en el gen <i>CYS4</i>
CYS4CR	[Phos]CGCAGTGAAGGCAGAACC	Oligonucleótido antisentido para la mutación de C301 en el gen <i>CYS4</i>
Hac1F	GTCAAACATAACAACCTCCTCCT CCCCACCTACGACAACAACCGC CACTcagctgaagcttcgtacgc	Oligonucleótido sentido para la delección del gen <i>HAC1</i>
Hac1R	AACAGCGATAATAACGAGAAAAA AAAAATTATACCCTCTTGCGATT GTCTcataggccactagtgatc	Oligonucleótido antisentido para la delección del gen <i>HAC1</i>
Hac1A	ATACATTTATGAGGGTTGTAAGGCA	Oligonucleótido sentido para la confirmación de la delección del gen <i>HAC1</i>
Hac1D	TTCTGCACTATAATAACGATTT	Oligonucleótido antisentido para la confirmación de la delección del gen <i>HAC1</i>
Cys4A	CACGTGATAGTAGTGGCTCAC	Oligonucleótido sentido para la confirmación de la delección del gen <i>CYS4</i>
Cys4B	GCGTTACCAAACACATCAGCG	Oligonucleótido antisentido para la confirmación de las mutaciones puntuales en el gen <i>CYS4</i>

Continuación Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio para la generación y confirmación de cepas.

Cys4D	GCGTTACCAAACACATCAGCG	Oligonucleótido antisentido para la confirmación de la delección del gen <i>CYS4</i>
Cys3A	TGACCGCCACACTGGACCCCA	Oligonucleótido sentido para la confirmación de la delección del gen <i>CYS3</i>
Cys3D	TTCTGCTTTACTGCCCGACCTTT	Oligonucleótido antisentido para la confirmación de la delección del gen <i>CYS3</i>

Los oligonucleótidos utilizados para eliminar genes y para las mutaciones puntuales en este proyecto fueron diseñados utilizando el programa Serial Cloner (versión 2.6, software desarrollado por Franck Perez, CNRS Institut Curie), y posteriormente se analizaron con la herramienta OligoAnalyzerTM Tool de la plataforma web Integrated DNA Technologies (IDT) para corroborar el porcentaje de GC, la formación de estructuras secundarias, la dimerización y la temperatura de TM. La secuencia de oligonucleótidos para la confirmación de delecciones y secuenciación de plásmidos se obtuvieron de bases de datos. Todos fueron sintetizados por Sigma Aldrich.

6.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

6.2.1 Medios de cultivo de bacterias

Los cultivos de *E. coli* para la extracción de plásmidos se realizaron en medio Luria Bertano o LB.

Tabla 4. Medio LB para el cultivo de bacterias.

Reactivo	Porcentaje de inclusión
Extracto de levadura	0.5
Triptona	1
NaCl	1
Agar*	2

**Se agregó agar cuando se preparó medio sólido para cultivo en cajas de petri.*

6.2.2 Medios de cultivo de levaduras

Los cultivos de levadura se realizaron en distintos medios dependiendo de la aproximación experimental.

Para el crecimiento normal de las cepas sin plásmido y para los experimentos con agentes inductores de estrés se utilizó el medio de crecimiento Yeast Extract Peptone Desxtrose o YPD.

Tabla 5. Medio YPD para el cultivo de levaduras.

Reactivo	Porcentaje de inclusión
Extracto de levadura	1
Peptona de gelatina	1
Dextrosa	2
Agar*	2

**Se agregó agar cuando se preparó medio sólido para cultivo en cajas de petri.*

Para seleccionar las cepas transformadas con plásmidos se utilizó el medio mínimo de crecimiento o MM, el cual contiene los nutrientes mínimos para su crecimiento y se pueden elegir los aminoácidos que lo conforman, ya que los plásmidos generalmente tienen como cassette de selección el gen de alguna auxotrofia.

Tabla 6. Medio Mínimo para el cultivo de levaduras.

Reactivo	Porcentaje de inclusión
Base nitrogenada de levadura	0.17
sin aminoácidos ni sulfato de amonio heightSulfato de amonio	0.5
Dextrosa	2
Agar*	2
Solución de aminoácidos**	1X

**Se agregó agar cuando se preparó medio sólido para cultivo en cajas de Petri.

**Solución de aminoácidos -met -cist -his -ura 10X(g/L): Adenina 0.2g, Arginina 0.2g, Asparagina 0.1g, Ácido glutámico 1g, Leucina 0.6g, Lisina 0.2g, Fenilalanina 0.5, Serina 3.75g, Treonina 2g, Triptofano 0.4g, Tirosina 0.3g, Valina 1.5g.

Para seleccionar las células mutantes se adicionaron los antibióticos ClonNat, Higromicina y la combinación de ambos a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dependiendo de la sensibilidad de la cepa. También se les agregaron los siguientes agentes inductores de estrés: H_2O_2 3mM, 5mM y 7mM; tunicamicina 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; L-cisteína 20 μM , 200 μM y 2mM.

6.3 Obtención de células termocompetentes

Para la delección de los genes y la transformación con plásmidos se realizaron células termocompetentes con las cepas BY4742, *cys4* Δ , *hac1* Δ y *cys4* Δ *hac1* Δ .

Para iniciar se inocularon 10mL de medio YPD líquido con una porción de colonia de cada cepa y se dejaron incubando a 37°C en agitación durante 48 horas. Posteriormente se calculó la concentración de células mediante la medición de densidad óptica (DO) a 600nm. Después se inoculó el volumen necesario para tener una DO de 0.2 en 50mL en un matríz con medio YPD fresco y se dejó incubar nuevamente a 37°C en agitación hasta que el cultivo llegara a 0.5 de DO. Cuando los cultivos alcanzaron la DO deseada, se transfirió el contenido del matríz a tubos falcon de 50mL y se centrifugó a 1500rpm durante 3 minutos. Luego

de esto, se decantó el sobrenadante, quedándose únicamente la pastilla con las células y se procedió a realizar 2 lavados con 5 mL de H_2O estéril y centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos. Una vez lavadas las células, se agregó SORB y se volvió a centrifugar. Por último, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 360 μL de SORB y 40 μL de ADN de esperma de salmón previamente hervido. Una vez resuspendidas las células, están listas las células termocompetentes, por lo que se hacen alícuotas de 20 μL y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

6.4 Transformación de levaduras por choque térmico para la delección de genes

6.4.1 Delección del gen *HAC1*

Para generar la cepa mutante *hac1* Δ se transformaron a células competentes con fondo genético BY4742 con el producto de PCR obtenido de la reacción indicada en la tabla 7 con el programa de PCR de la tabla 8. Para la transformación se mezclaron 20 μL de células competentes BY4742 con 500 ng de ADN del producto de PCR. Se agregó 100 μL del reactivo Plate mixture y se dejó incubando a temperatura ambiente (24°C) durante 30 minutos. Posteriormente se agregó 15 μL de DMSO estéril y en un baño María a 42°C durante 15 minutos. Después, se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 segundos para precipitar las células y se retiró el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 500 μL de medio YPD y se incubó durante 4 horas a 30°C . Una vez terminada la incubación, se volvió a precipitar las células, se retiró el sobrenadante dejando unos 200 μL y con ese volumen se resuspendió la pastilla de células. Por último, se pasó el contenido a cajas de Petri con medio sólido con los antibióticos de selección, en este caso higromicina, y se plaqueó con la ayuda de perlas de vidrio estériles. Se dejó incubando las cepas el tiempo suficiente para la formación de colonias completas, usualmente entre 2-4 días.

Tabla 7. Mezcla de PCR para la delección de *HAC1*.

Mezcla para PCR	
Volúmen	Reactivo
cbp 20 μ L	H_2O estéril
4.0 μ L	Buffer Phusion HF 5X
0.4 μ L	dNTP's 10 nM
2.0 μ L	Templado pUG32 1 ng/mL
1.0 μ L	Oligonucleótido Hac1F 10 μ M
1.0 μ L	Oligonucleótido Hac1R 10 μ M
0.2 μ L	Phusion ADNpolimerasa

Tabla 8. Programa de PCR para la delección de *HAC1*.

Condiciones de PCR	
Etapas del programa	Temperatura y tiempo
Desnaturalización inicial	95°C, 30 seg
Desnaturalización	95°C, 10 seg
Hibridación	55°C, 30 seg
Extensión	72°C, 30 seg
Extensión final	72°C, 10 min
Hold	10°C, ∞
Número de ciclos	35

6.4.2 Cepa *cys4* Δ *hac1* Δ

Para generar la cepa *cys4* Δ *hac1* Δ se transformaron células competentes del fondo genético *cys4* Δ con el producto de PCR obtenido de la reacción indicada en la tabla 8 y con el programa de la tabla 9. El protocolo fue el mismo que el descrito en el punto 6.4.1 pero se utilizaron células competentes *cys4* Δ y se agregó la combinación de antibióticos Higromicina + ClonNat en las cajas de YPD en la incubación final.

6.5 Confirmación de la delección de genes

Para confirmar las colonias de cepas transformadas en este estudio y las que se utilizarán del banco de cepas del laboratorio, se realizó la técnica de PCR de colonia. Este experimento se efectuó en las colonias transformantes y en colonias de la cepa BY4742 para comparar los genes naturales contra los cassettes de selección. Las cepas que se confirmaron fueron: *cys4*Δ, *cys3*Δ, *hac1*Δ y *cys4*Δ*hac1*Δ.

Se tomó un fragmento de colonia con una punta de pipeta estéril y se depositó en un tubo con 10 μL de agua estéril. Posteriormente, se disolvió la colonia en el agua y se comenzó con la lisis al guardarse a -20°C durante 2 minutos. Después de este tiempo, el tubo se agitó con ayuda de un vortex durante 4 segundos y se transfirió a un baño maría a 95°C donde se dejó hervir durante 2 min. Este proceso para lisar las células se repitió 2 veces. Por último se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 segundos, se resuspendió la pastilla que se formó al fondo del tubo y de ahí se tomaron 2 μL para la reacción de PCR que se indica en la tabla 9 y con el programa de la tabla 10.

Tabla 9. Mezcla de PCR para la delección de HAC1.

Mezcla para PCR de colonia	
Volúmen	Reactivo
18.8 μL	H ₂ O estéril
2.5 μL	Buffer Taq 10X
0.5 μL	dNTP's 10 nM
2.0 μL	Templado extracto de colonia
0.5 μL	Oligonucleótido A* 10 μM
0.5 μL	Oligonucleótido D* 10 μM
0.2 μL	Dream Taq polimerasa

* Los oligonucleótidos que se utilizaron fueron los A y D correspondientes a cada gen, por ejemplo para confirmar la delección del gen CYS4 se utilizaron Cys4A y Cys4D.

Tabla 10. Programa de PCR para la delección de HAC1.

Programa para PCR de colonia	
Etapas del programa	Temperatura y tiempo
Desnaturalización inicial	95°C, 30 seg
Desnaturalización	95°C, 10 seg
Hibridación	X*, 30 seg
Extensión	72°C, 30 seg
Extensión final	72°C, 10 min
Hold	10°C, ∞
Número de ciclos	35

**Para la etapa de hibridación se utilizaron diferentes temperaturas: CYS4-55°C, CYS3-55°C y HAC1-52°C.

6.6 Alineación de secuencias de proteínas homólogas

Para observar los grados de conservación entre los residuos de aminoácidos de la cistationina β -sintasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Cys4p) y de *Homo sapiens* (CBS) se realizó el alineamiento de sus secuencias. Las secuencias lineales de aminoácidos se obtuvieron del sitio de libre acceso UniProt. Las secuencias de ambos organismos se alinearon usando el software de libre acceso ClustalOmega.

6.7 Alineación de las estructuras de proteínas homólogas

Además de la secuencia lineal de aminoácidos, también se realizó la comparación de la estructura terciaria de ambas cistationina β -sintasa. Los cristales de las proteínas se obtuvieron del portal en línea de libre acceso Protein Data Bank RCSB-PDB. El cristal correspondiente a Cys4p es 6C2Z y el correspondiente a CBS es 1JBQ. Los cristales se analizaron mediante el software de visualización PyMOL by Schrödinger de manera individual en primera instancia y alineados en segunda.

6.8 Mutagénesis direccional

Se realizaron tres mutaciones puntuales en la estructura de Cys4p, el cambio de su serina 289 por aspartato (S289D), el de su cisteína 301 por serina (C301S) y su cisteína 301 por tirosina (C301Y). Estas mutaciones se realizaron sobre el plásmido pRM06 que contiene al gen *CYS4* completo. Para el cambio en la secuencia de aminoácidos se modificaron los codones correspondientes que se muestran en la tabla 11, siguiendo la secuencia de trabajo de la figura 3.

Tabla 11. Cambio en los codones de *CYS4*.

Cambios en los codones del gen <i>CYS4</i>			
codón natural	Aminoácido	codón nuevo	Aminoácido nuevo
TCT	Serina (S)	GAT	Aspartato (D)
TGT	Cisteína (C)	TCT	Serina (S)
TGT	Cisteína (C)	TAT	Tirosina (Y)

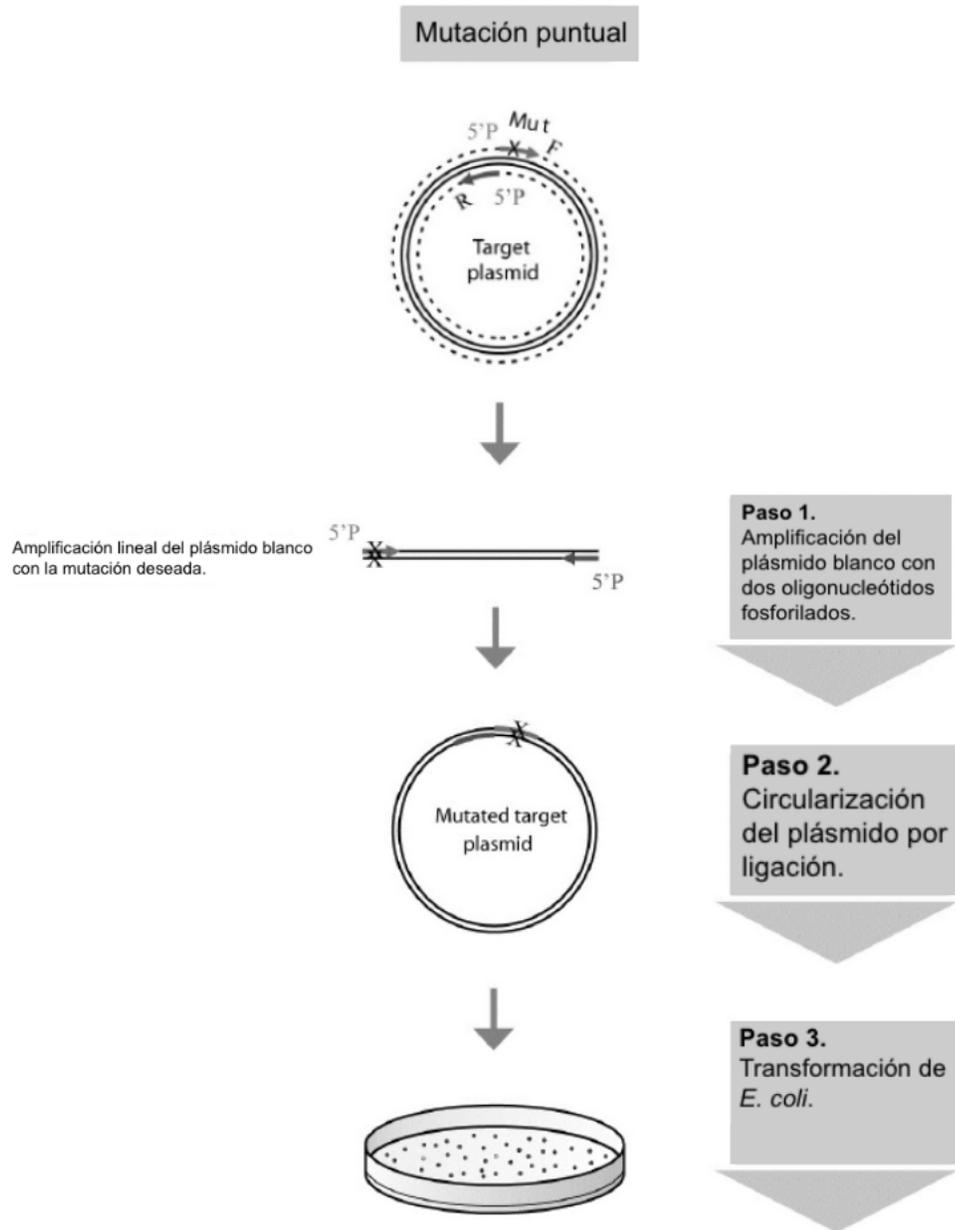


Figura 3. Plan de trabajo para la mutagénesis direccional (modificado de 49). Se diseñan oligonucleótidos fosforilados en los que el codón a modificar quede en medio de uno de ellos. Se amplifica el plásmido blanco donde se tiene el gen a mutar. Se recirculariza el plásmido y se seleccionan las bacterias transformantes utilizando medio de selección. Por último se purifica el plásmido con la mutación y se transfectan células de levadura.

Se inició con una reacción de PCR para realizar cambios de las bases nucleotídicas con la reacción de PCR de la tabla 12 y el programa de la tabla 13.

Tabla 12. Mezcla de PCR para mutagénesis direccionada.

Mezcla de PCR	
Volúmen	Reactivo
cbp 50 μL	H_2O estéril
10 μL	Buffer Phusion HF 5X
1 μL	dNTP's 10 nM
1 μL	Templado ADN (pRMV06)
2.5 μL	Oligonucleótido F* 10 μM
2.5 μL	Oligonucleótido R* 10 μM
0.5 μL	Phusion Hot Start DNA polimerasa

**Los oligonucleótidos se encuentran fosforilados en su región 5' para facilitar la recircularización.*

Tabla 13. Programa de PCR para mutagénesis direccionada.

Programa de PCR	
Etapas del programa	Temperatura y tiempo
Desnaturalización inicial	98°C, 30 seg
Desnaturalización	98°C, 10 seg
Hibridación	65°C, 30 seg
Extensión	72°C, 2 min
Extención final	72°C, 10 min
Hold	10°C, ∞
Número de ciclos	35

Posteriormente se cuantificó la cantidad de plásmido mediante el NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones de fábrica. Una vez obtenida la concentración de nuestro producto de PCR se procedió a recircularizar el plásmido por medio de la ADN ligasa T4. Para la ligación se hizo previamente la digestión del producto por la enzima de restricción Dpn1 agregando 1 μL de enzima a los 50 μL de nuestro producto de PCR y se dejó incubar por 15 minutos a 37°C. Posteriormente se hizo la ligación mediante la reacción

indicada en la tabla 14. La reacción se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y se dejó enfriar en hielo durante 15 minutos.

Tabla 14. Mezcla de ligación para mutagénesis direccionada.

Mezcla de ligación	
Volúmen	Reactivo
5 μL	H_2O estéril
2 μL	Rapid Ligation Buffer 5X
2.5 μL	Plásmido
0.5 μL	ADNligasa T4

Una vez obtenido el plásmido ligado, se transformó en células de *E. coli*. Inicialmente, se mezcló 10 μL del plásmido con 100 μL de células de *E. coli* termocompetentes y se dejó incubar por 30 minutos en hielo. El choque térmico se dió en baño maría a 42°C durante 45 segundos. Después, se dejó enfriar las células en 5 minutos, se adicionó 500 μL de medio LB fresco y se dejó recuperar a las células durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se precipitaron las células por centrifugación a 14,000 rpm durante 15 segundos y se retiró casi todo el sobrenadante. Por último, con lo que quedó de sobrenadante se resuspendieron las células y se plaqueó en cajas de medio sólido de LB+ampicilina con ayuda de perlas de vidrio. Las cajas se dejarón incubando a 37°C durante 18 horas.

A partir de las colonias transformantes se dejó crecer un precultivo en 10 mL de medio líquido LB+ ampicilina durante 18 horas a 37°C en agitación. Posteriormente se realizó la purificación de plásmido utilizando el kit comercial de purificación ZR Plasmid Miniprep (Zymo Research) siguiendo las especificaciones del producto.

Por último se corroboró que la reacción de PCR y la ligación ocurrió adecuadamente. Para esto se realizó la digestión del plásmido purificado con las enzimas de restricción EcoRV y XbaI con la reacción indicada en la tabla 15. La digestión se dejó incubar a 37°C durante toda la noche y se corrió el contenido en un gel de Agarosa 0.8%. Las bandas resultantes de la escisión de nucleótidos se muestran en la figura 7.13.2. Las mutaciones puntuales fueron corroboradas mediante secuenciación en la Unidad de Biología Molecular del IFC-UNAM.

Tabla 15. Mezcla de digestión enzimática para mutagénesis direccional.

Mezcla de digestión	
Volúmen	Reactivo
2 μ L	Plásmido
2 μ L	Buffer O
0.5 μ L	Enzima EcoRV
0.5 μ L	Enzima XbaI
15 μ L	H ₂ O estéril

6.9 Transformación de levaduras por choque térmico con plásmidos

Se realizó la transformación de las células competentes obtenidas como se explica en la sección 6.3 para generar las cepas con los plásmidos indicados en la tabla 16.

Tabla 16. Plásmidos insertados en las cepas de levadura.

Plásmido	Fondo genético
pRS416	BY4742 <i>cys4</i> Δ <i>hac1</i> Δ <i>cys4</i> Δ <i>hac1</i> Δ
C4S289D	<i>cys4</i> Δ
C4C301S	<i>cys4</i> Δ
C4C301Y	<i>cys4</i> Δ

El protocolo de transformación fue el mismo que el descrito en la sección 6.4.1, con la diferencia del medio sólido de las cajas en la incubación final. En este caso se utilizaron cajas con MM sin el aminoácido cuya auxotrofia cura el marcador del plásmido. Para las transformaciones en el fondo genético *cys4* Δ se agregó además cisteína, ya que naturalmente esta mutante es auxótrofa a este aminoácido. En la tabla 17 se indican los aminoácidos que se agregaron o se quitaron de la solución de aminoácidos.

Tabla 17. Medio Mínimo de selección para la transformación con plásmidos.

Construcción	Medio sólido
BY4742 + pRS416	MM+His-Ura
<i>cys4</i> Δ + pRS416	MM+His-Ura+Cis
<i>hac1</i> Δ + pRS416	MM+His-Ura
<i>cys4</i> Δ <i>hac1</i> Δ + pRS416	MM+His-Ura+Cis
<i>cys4</i> Δ + C4S289D	MM+His-Ura+Cis
<i>cys4</i> Δ + C4C301S	MM+His-Ura+Cis
<i>cys4</i> Δ + C4C301Y	MM+His-Ura+Cis

6.10 Técnica del goteo

Para esclarecer el fenotipo de sensibilidad a cierto estrés, se utilizó la técnica semicuantitativa del goteo. El flujo de trabajo que se realizó se indica en la Figura 4.

Para comenzar se inoculó una fracción de colonia de levadura en 10 mL de medio YPD líquido y se incubó a 30°C durante 48 horas en agitación constante. Pasada esa incubación, se midió la densidad óptica (DO) a 600nm de los cultivos y en placas de 96 pozos se realizó una primera dilución para tener nuestros cultivos a DO de 1. Posteriormente se hizo una segunda dilución, en este caso una dilución quíntuple seriada 1/10. Después, en cajas de medio sólido, se agregaron 5 μ L de cada dilución. El medio de las cajas fue YPD o MM y se le adicionó tunicamina y/o cisteína y/o H₂O₂ y/o homocisteína dependiendo del experimento. Para finalizar, las cajas se incubaron a 30°C de 2-4 días, dependiendo de las cepas, y se les tomó fotografía.

También se realizaron goteos en cajas de medio YPDL (Yeast Peptone Dextrose and Lead) para un análisis semicuantitativo de la producción de H₂S. Estos goteos se hicieron siguiendo las indicaciones anteriores, con la modificación que aquí no se realizaron las diluciones seriadas.

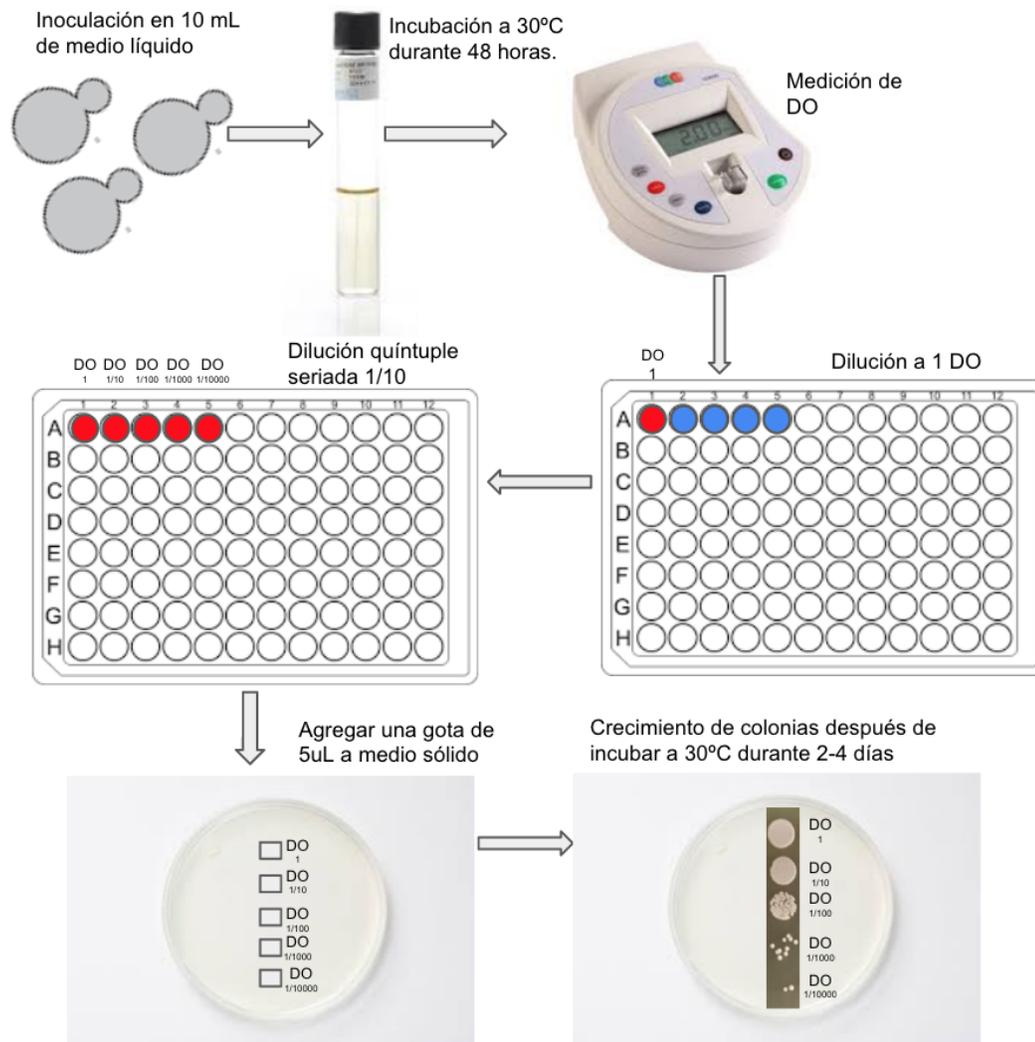


Figura 4. Flujo de trabajo de los goteos. Se inoculan medio YPD y tras una incubación se calcula la concentración a través de la densidad óptica(DO). Se diluyen los cultivos a 1 DO en 100 μ L y se realizan 4 diluciones seriadas 1/10. Se inoculan las diluciones en medio con las condiciones experimentales y se dejan incubar el tiempo necesario.

6.11 Estandarización de sensibilidad a tunicamicina en medio líquido

Para observar las concentraciones adecuadas de tunimacina para la supervivencia de las cepas, se realizó una estandarización en placa. Para iniciar, se inocularon tubos de 10 mL de YPD líquido con las cepas de levadura y se incubaron a 30°C durante 48 horas en agitación

constante. Después se calculó la concentración por medio de la DO y se diluyó a DO 0.1. En una placa de 96 pozos se inocularon 400 μL de medio YPD con 20 μL de células para alcanzar una DO final de 0.01. Posteriormente se agregaron 4 concentraciones de tunicamicina: 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La placa con los cultivos se dejó incubar a 30°C durante 48 horas y se observó el crecimiento de las cepas.

6.12 Curvas de crecimiento

El análisis cuantitativo del fenotipo de una cepa a través de las cinéticas de crecimiento, ofrece resultados más certeros y confiables que los goteos. En la figura 5 se representa la metodología para este experimento.

A partir de cultivos de levadura de las cepas correspondientes se tomó una porción de 10 colonias aisladas y se inocularon en 2 mL de medio YPD con el antibiótico de selección de la cepa en placas profundas de 24 pozos. Las placas se dejaron incubando a 30°C durante 48 horas. Los cultivos se diluyeron 1/10 en 100 μL de H_2O estéril y se midió la DO para posteriormente ajustarla a 0.1 en 200 μL de H_2O estéril. Se volvió a hacer otra dilución para ajustarla a una DO final de 0.01 en 200 μL dentro de la placa de 100 pozos del lector de placas Microplate Reader Standard Operating Procedure Synergy-HT Biotek. En esta fase se agregó 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tunicamicina en el experimento correspondiente. El lector de placas se programó para medir la DO cada 15 minutos durante 48 horas y transcurrido este tiempo se analizaron los resultados con el programa de visualización del lenguaje de programación R de libre acceso , R-Studio.

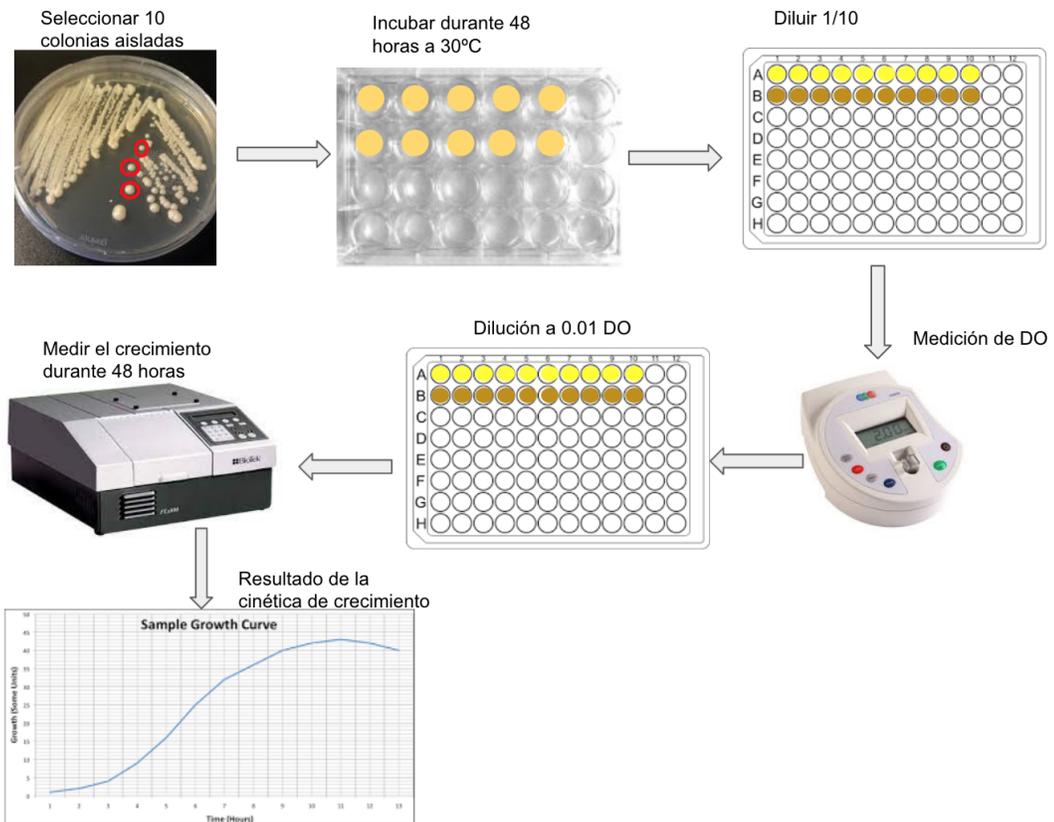


Figura 5. Flujo de trabajo de la cinética de crecimiento. Se toman colonias aisladas, se incuban el tiempo correspondiente y se diluyen 1/10. Se calcula la concentración por medio de la DO y se diluyen los cultivos a 0.01 DO en 200 μ L. Se mide el crecimiento en tiempo real durante 48 horas y se analizan los resultados.

7 Resultados

7.1 Delección del gen *HAC1*

En levaduras, una de las formas más eficientes para la eliminación de genes es mediante el uso de plásmidos de delección. La plataforma que usa estos plásmidos se ejemplifica en la figura 6.

Los plásmidos de delección en levaduras generalmente contienen dos cassettes de selección basados en antibióticos, uno para bacterias y el otro para levaduras. Los oligonucleótidos con los que se realizará la delección contienen dos secuencias. La primera corresponde a una secuencia compartida en todos los plásmidos de selección y que se encuentran en los extremos de los cassettes. La segunda secuencia se compone de 50 bases río arriba y 50 bases río abajo, en los oligos sentido y antisentido correspondientemente, de la secuencia genética blanco de la delección. De esta manera al realizar amplificaciones mediante PCR obtendremos el cassette de selección bordeado por las secuencias idénticas al del gen. Durante la transformación se integrará el cassette mediante el mecanismo de recombinación homóloga que naturalmente ocurre en las levaduras y de esta manera obtendremos la delección del gen objetivo. Cabe mencionar que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que se utilizan son haploides, lo que hace más eficiente esta técnica de delección. Por último, el gen de resistencia a antibióticos codificado en el cassette de selección permite el crecimiento selectivo de las cepas mutantes.

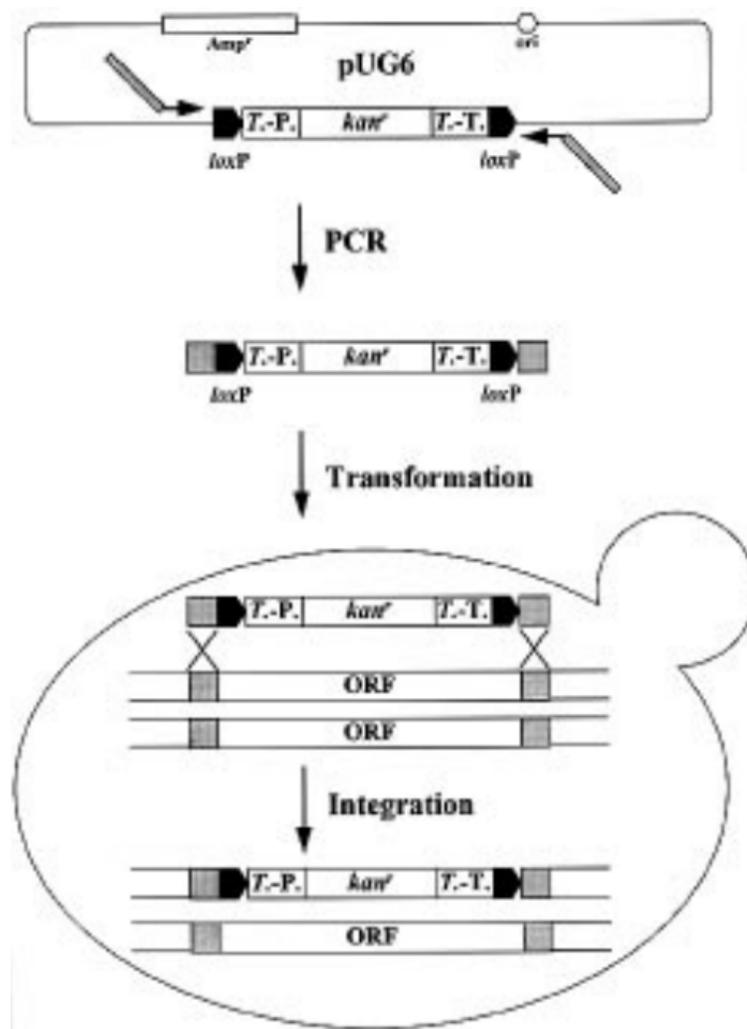


Figura 6. Deleción de genes mediante recombinación homóloga (Modificado de 50). Se amplifica el cassette de selección utilizando oligonucleótidos con secuencia idéntica al cassette y al gen a deletar, obteniendo así el cassette de selección. Se transforman células competentes de levadura, dónde el cassette se integrara por recombinación homóloga en el locus específico del gen a deletar.

Para la generación de las cepas *hac1*Δ y *cys4*Δ*hac1*Δ se inició amplificando los plásmidos pAG25 y pAG32 con los oligonucleótidos Hac1F y Hac1R para obtener el cassette de selección para la deleción del gen *HAC1*. Posterior al PCR se corroboró la correcta amplificación a través de un gel de agarosa al 0.8% que se muestra en la figura 7. En el carril 5 se tiene el marcador de peso molecular para corroborar el tamaño del amplicón obtenido de la PCR. En los carriles 1 y 3 se tiene la amplificación del plásmido pAG32 que corresponde a 1863 pb. En los carriles 2 y 4 se tiene la amplificación del plásmido pAG25 que corresponde a 1407 pb.

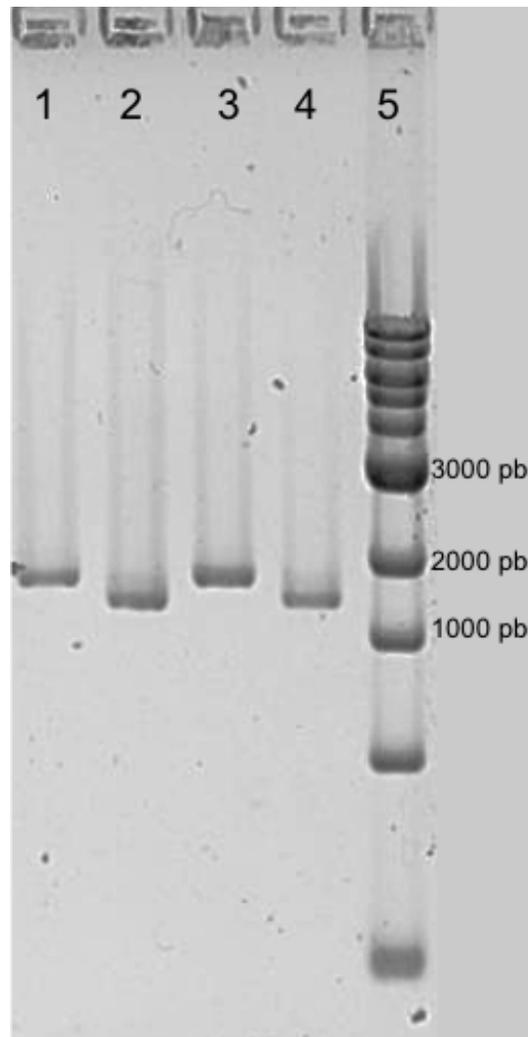


Figura 7. Gel de agarosa de la amplificación de los plásmidos pAG25 y pAG32. En los carriles 1 y 3 se tienen amplicones del plásmido pAG32 y en los carriles 2 y 4 amplicones del plásmido pAG25

Como podemos observar en la figura 7, se obtuvieron satisfactoriamente las bandas correspondientes al cassette de resistencia a los antibióticos ClonNat e Higromicina de los plásmidos pAG25 y pAG32 respectivamente, flanqueados de 50 nucleótidos del gen *HAC1*. Usando estas secuencias de ADN se transformaron células competentes del fondo genético BY4742 para obtener la cepa *hac1* Δ con las muestras de los carriles 1 y 3, y del fondo genético *cys4* Δ para obtener la cepa *cys4* Δ *hac1* Δ con las muestras de los carriles 2 y 4. Las células transformantes se dejaron crecer en medio con antibiótico para la posterior corroboración de las mismas.

7.2 Confirmación de las cepas *hac1*Δ, *cys4*Δ, *cys4*Δ*hac1*Δ y *cys3*Δ

Durante la transformación se llevó a cabo la delección del gen *HAC1* a través de recombinación homóloga, mecanismo natural de la levadura, gracias a que el cassette de selección contiene secuencias complementarias del propio gen. Este proceso se ejemplifica en la figura 8.

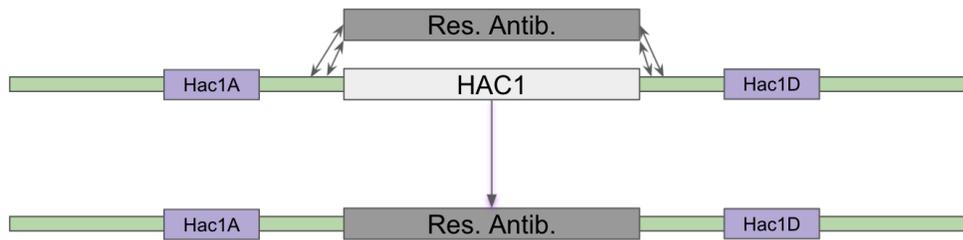


Figura 8. Recombinación homóloga para la delección del gen HAC1. El cassette de resistencia a antibióticos bordeado por la secuencia del gen nativo se integra al genoma por recombinación homóloga. Río arriba y río abajo encontramos a los oligonucleótidos A y D respectivamente.

De esta manera las colonias que crecieron en el medio con antibiótico posterior a la transformación, serán células donde ocurrió la recombinación homóloga de manera exitosa. De esta manera obtenemos cepas donde en lugar del gen *HAC1*, tenemos el gen que codifica para la proteína de resistencia a antibióticos integrado al genoma de las células. Sin embargo, podría ocurrir que el cassette de selección se inserte en otra región, resultando en resistencia al antibiótico sin perder el gen que se desea deletar. Para asegurar que la recombinación ocurrió en el marco abierto de lectura (ORF) del gen, se realizó un PCR de colonia de confirmación. En la reacción se usaron los oligonucleótidos A y D correspondientes al gen *HAC1*, Hac1A y Hac1D. Como se puede observar en la figura 8 los oligonucleótidos A y D contienen una secuencia de nucleótidos complementarios a regiones de alrededor de 200 bases río arriba y río abajo del gen objetivo. De esta manera, al correr los amplicones resultantes en un gel de agarosa al 0.8% obtendremos bandas de un tamaño correspondientes al cassette de selección y no del gen objetivo.

Las PCR de colonia se realizaron en células del fondo genético BY4742 y células *cys4*Δ que fueron transformadas con el cassette de selección rodeado de los oligos Hac1F y Hac1R que, tentativamente, corresponden a las cepas *hac1*Δ y *cys4*Δ*hac1*Δ. El gel de agarosa al 0.8% de la reacción se observa en la figura 9. El carril número 7 corresponde al marcador de peso molecular para identificar los fragmentos de ADN. En el carril 1 se tiene la reacción a partir de células *hac1*Δ con oligonucleótidos Hac1A y Hac1D, con una banda esperada de 1595 nucleótidos. En el carril 2 se tiene la reacción a partir de células *cys4*Δ*hac1*Δ con oligonucleótidos Hac1A y Hac1D, con una banda esperada de 1595 nucleótidos. En los carriles 3 y 4 se tiene la reacción a partir de células *cys4*Δ*hac1*Δ con oligonucleótidos Cys4A y Cys4D, con una banda esperada de 2284 nucleótidos. En los carriles 5 y 6 se tiene la reacción a partir de células *cys4*Δ con oligonucleótidos Cys4A y Cys4D, con una banda esperada de 2284 nucleótidos.

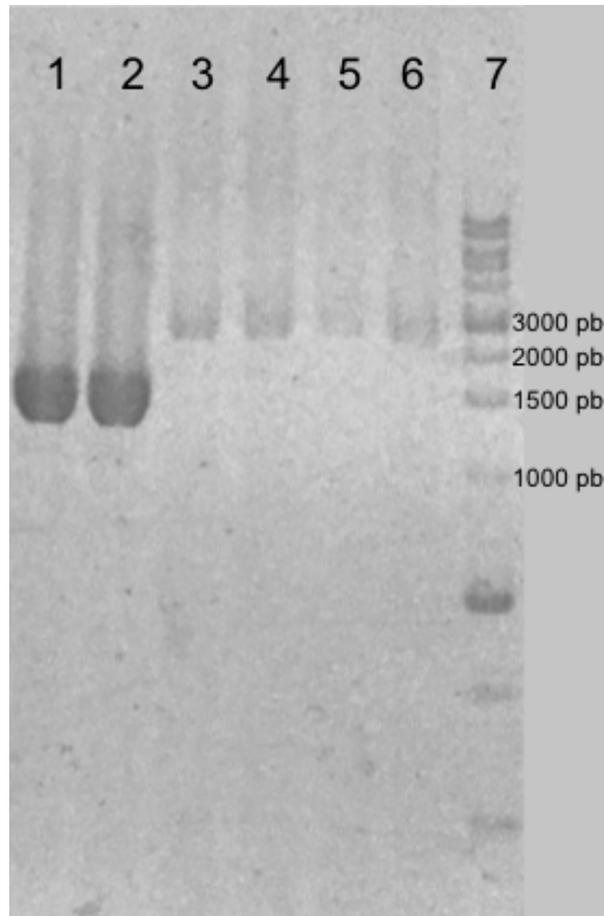


Figura 9. Gel de agarosa de la confirmación de delección de los genes *HAC1* y *CYS4*. En los carriles 1 y 2 tenemos los amplicones de la confirmación de la delección del gen *HAC1*. En los carriles 3, 4, 5 y 6 tenemos los amplicones de la confirmación de la delección del gen *CYS4*

Como se puede observar en el carril 1 de la figura 9, la banda obtenida de 1595 nucleótidos corresponde al ORF del cassette de selección de resistencia a higromicina más las bases río arriba y río abajo hasta la secuencia de los oligonucleótidos A y D, en lugar del ORF natural del gen *HAC1*. Con esto podemos corroborar la correcta integración del cassette de selección en el sitio del gen *HAC1*, confirmando así la cepa *hac1*Δ. En los carriles 2,3 y 4 se pueden observar amplificaciones de dos genes distintos de la misma colonia. En el carril 2 se amplificó usando los oligonucleótidos *Hac1A* y *Hac1D* y obtenemos un resultado similar al del carril 1. En el carril 3 y 4 se encuentran muestras que fueron amplificadas con los oligonucleótidos *Cys4A* y *Cys4D*. La banda obtenida de 2284 nucleótidos corresponde al ORF del cassette de selección de resistencia a ClonNat más las bases río arriba y río abajo

hasta la secuencia de los oligonucleótidos A y D, en lugar del ORF natural del gen *CYS4*. Con el resultado de los carriles 2,3 y 4 confirmamos la generación de la cepa *cys4Δhac1Δ*. En los carriles 5 y 6, la banda obtenida de 2284 nucleótidos corresponde al ORF del cassette de selección de resistencia a ClonNat más las bases río arriba y río abajo hasta la secuencia de los oligonucleótidos A y D, en lugar del ORF natural del gen *CYS4*. Con el resultado de estos últimos carriles confirmamos la cepa con la que ya se contaba en el laboratorio: *cys4Δ*.

7.3 Sensibilidad de la cepa *cys4Δ* a estrés de retículo endoplásmico

La técnica del goteo permite poner en evidencia el fenotipo de una cepa a un estrés en particular de manera semi cuantitativa. Se inició exponiendo a las cepas *cys3Δ* y *cys4Δ* a tres concentraciones de tunicamicina. Como ya se explicó anteriormente, la tunicamicina es un antibiótico que inhibe la glicosilación de proteínas a nivel de retículo endoplásmico. Las proteínas que requieren esta modificación post-traducciona para madurar se acumularán en el retículo endoplásmico, dando lugar a estrés de retículo endoplásmico. Como se puede observar en la figura 10, ambas cepas mutantes y la cepa silvestre (*WT*) se cultivaron en medio YPD más 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 0.75 $\mu\text{g/mL}$ y 1 $\mu\text{g/mL}$ de tunicamicina (tm). En la concentración de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ observamos una sensibilidad muy marcada de la cepa *cys4Δ*, ya que solo crece hasta la primera dilución, las otras dos cepas crecen normalmente. En la concentración 0.75 $\mu\text{g/mL}$ la cepa *cys3Δ* también muestra sensibilidad, la cepa *cys4Δ* unicamente crece la primera dilución y unas cuantas colonias en la segunda. La cepa silvestre es resistente a las primeras dos concentraciones de tunicamicina, sin embargo con 1 $\mu\text{g/mL}$ muestra cierto grado de sensibilidad, ya que solo crece la segunda dilución y algunas colonias en la tercera. A 1 $\mu\text{g/mL}$ la cepa *cys4Δ* le cuesta crecer incluso en la gota correspondiente a la DO de 1.

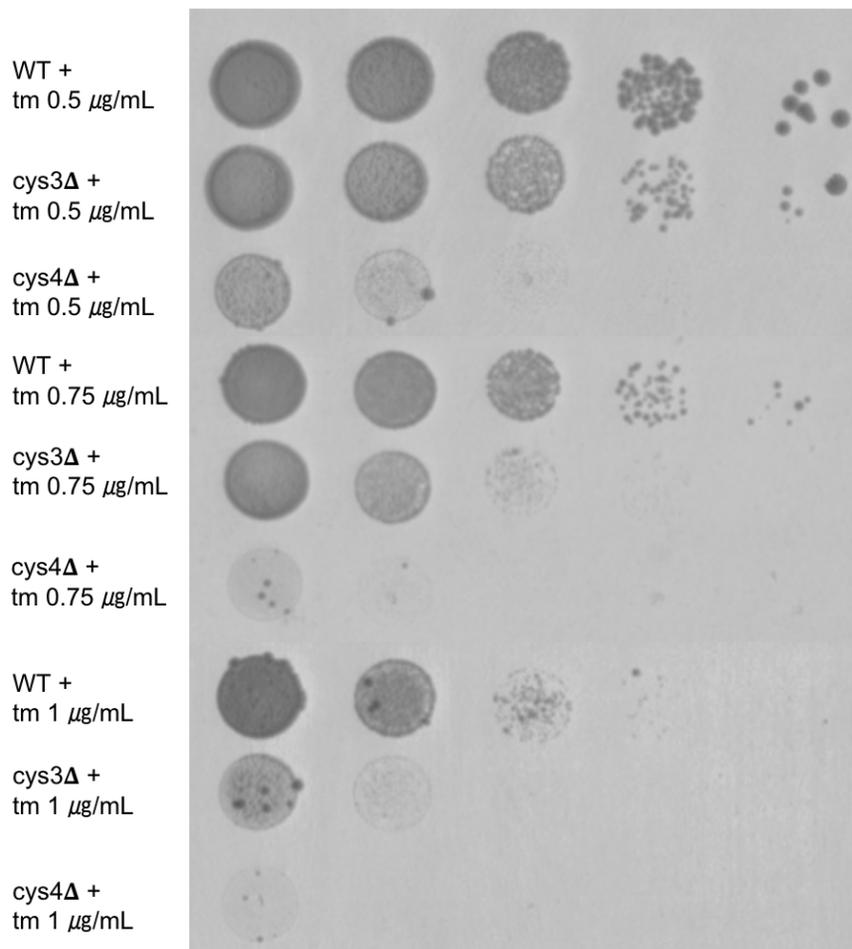


Figura 10. Sensibilidad a estrés de retículo endoplásmico de las cepas cys4Δ y cys3Δ. Las cepas WT, cys4Δ y cys3Δ se cultivaron en medio con 0.5 μg/mL, 0.75 μg/mL y 1 μg/mL de tm. Las dos cepas mutantes muestran sensibilidad al antibiótico tunicamicina, especialmente cys4Δ.

Con este resultado se observa que la proteína Cys4p es esencial para la correcta adaptación a estrés de retículo endoplásmico. Por otro lado, parece que la proteína Cys3p también es importante para la adaptación, pero en menor grado que Cys4p. Como se describió en la introducción de este trabajo, tanto Cys4p como Cys3p son enzimas que pertenecen a la vía de la trans-sulfuración y su actividad catalítica canónica consiste en la generación de cisteína. Por otro lado, estas dos enzimas tienen actividades catalíticas alternas mediante las cuales se produce H₂S.

7.4 La acumulación de homocisteína no es responsable de la sensibilidad de la cepa *cys4*Δ a estrés de retículo endoplásmico

Anteriormente se ha reportado que el aminoácido no proteico homocisteína puede actuar como agente oxidante, que puede desencadenar estrés proteotóxico en las células (54). Por lo tanto, una posibilidad de la sensibilidad acentuada de la cepa *cys4*Δ es que la acumulación de homocisteína, resultado de la ausencia de la enzima que la transforma en cistationina, provoca el fenotipo observado. Para corroborar lo anterior se realizaron goteos de las tres cepas en medio YPD con concentraciones de homocisteína 2mM únicamente y con tunicamicina a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como se observa en la figura 11 las tres cepas crecen correctamente en medio con homocisteína 2mM. Cuando se agregó, además de la homocisteína, tunicamicina 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no hay cambios en la sensibilidad ni en la cepa silvestre ni en la *cys3*Δ.

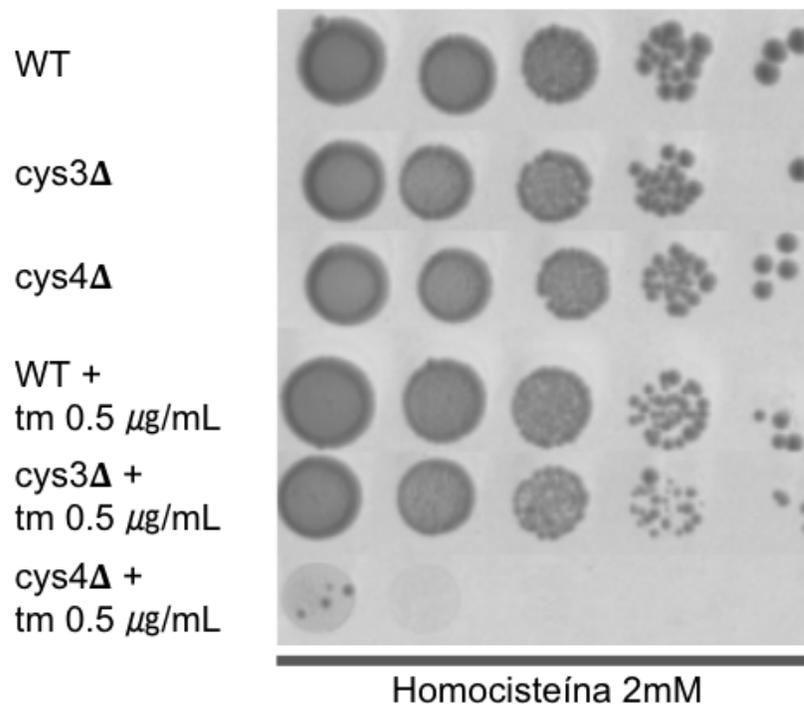


Figura 11. Acumulación de homocisteína no causa la sensibilidad en *cys4*Δ. Las cepas WT, *cys4*Δ y *cys3*Δ se cultivaron en medio con 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tm y 2 mM de homocisteína. La homocisteína no afecta el crecimiento de ninguna cepa aún con tm.

Con esto podemos concluir que la sensibilidad de *cys4*Δ no es por la concentración

de homocisteína acumulada y la sensibilidad podría depender de alguna de las actividades catalíticas de estas proteínas.

7.5 La adición de cisteína cura la sensibilidad de la cepa *cys4*Δ a estrés de retículo endoplásmico

La cisteína es un aminoácido importante para la respuesta a estrés oxidativo, ya que es necesaria para la producción de glutatión, molécula esencial para los procesos de óxido-reducción de la célula. Este podría ser el motivo de la sensibilidad de estas proteínas, por lo que se realizaron goteos de las tres cepas en las concentraciones de tunicamicina 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con las concentraciones de cisteína 20 μM , 200 μM y 2mM.

En la figura 12 se observan los goteos en las distintas condiciones, en las que la cisteína ayuda a reducir el fenotipo de sensibilidad a estrés de retículo endoplásmico. La cisteína 2mM recupera el crecimiento de la cepa *cys4*Δ en 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ casi idéntico a la cepa silvestre (a). En las concentraciones de 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (b) y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (c) la cisteína ayuda a recuperar el crecimiento de todas las cepas, aunque la acción de la tunicamicina es demasiado fuerte para recuperar el crecimiento original.

Resulta interesante que la cepa *cys3*Δ sea no solamente menos sensible a tunicamicina, si no que además tiene una mayor recuperación al agregar cisteína al medio. Con esto podemos concluir que la cisteína ayuda a recuperar a las células de estrés de retículo endoplásmico incluso en concentraciones altas de tunicamicina.

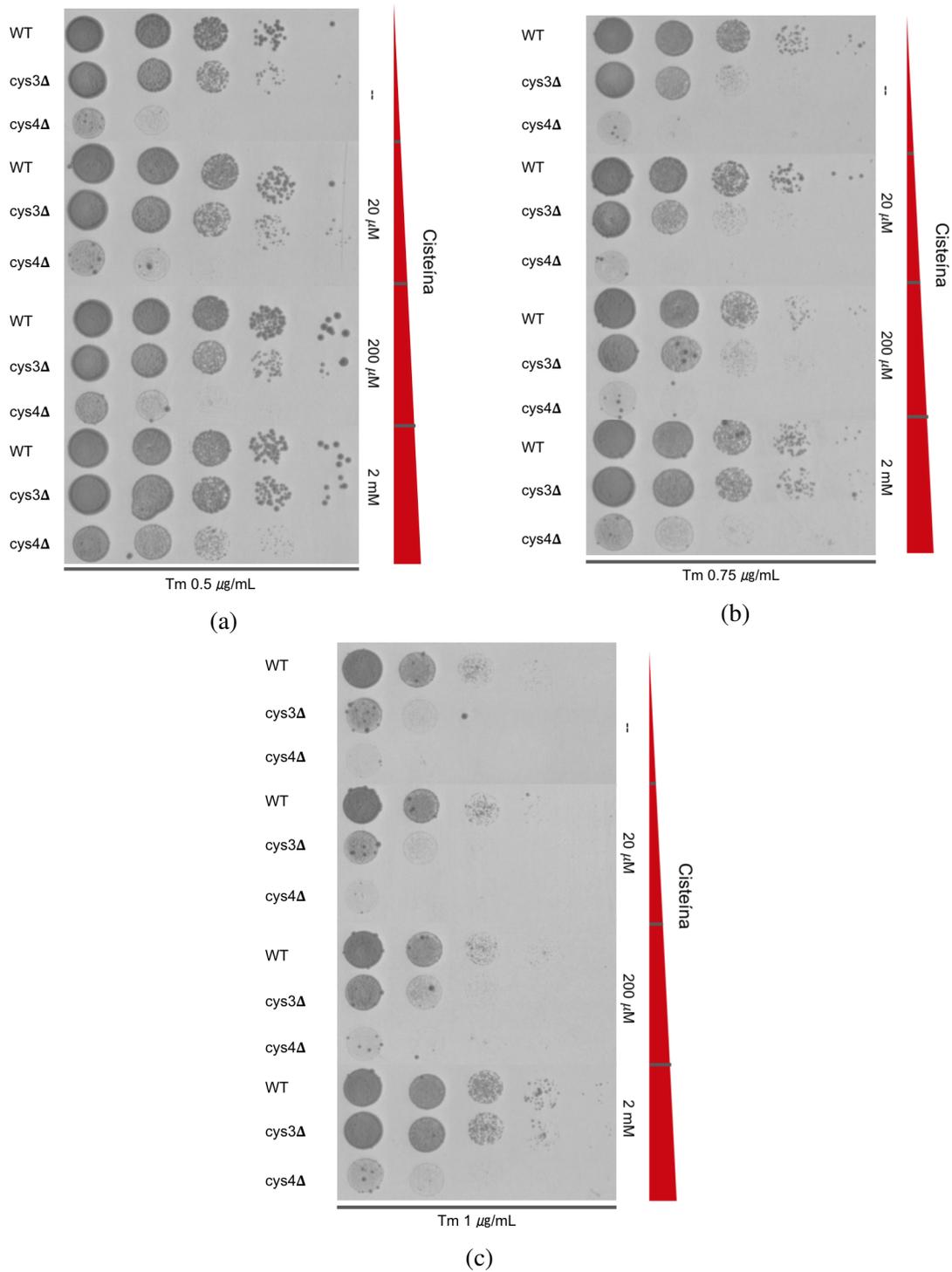


Figura 12. Recuperación del crecimiento bajo estrés de retículo endoplásmico con la adición de cisteína. Las cepas WT, *cys4* Δ y *cys3* Δ se cultivaron en medio con 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 0.75 $\mu\text{g/mL}$ y 1 $\mu\text{g/mL}$ de *tm* con 20 μM , 200 μM o 2 mM de cisteína. La adición de cisteína disminuye la sensibilidad a *tm*

Curiosamente, *cys4* Δ es más sensible que *cys3* Δ y, al estar en la misma ruta metabólica,

los fenotipos de las mutantes deberían ser parecidos si el motivo de la sensibilidad es la falta del metabolito final de la ruta. Además de lo anterior, ya se ha reportado que al agregar glutatión al mismo tiempo que tunicamicina no se recupera el crecimiento de la cepa *cys4* Δ (55). Como se mencionó en la sección de introducción de este trabajo, tanto Cys4p como Cys3p además de su actividad canónica pueden producir H₂S utilizando como sustrato a la cisteína. Sin embargo, esto tampoco explica la diferencia en sensibilidad de ambas proteínas, ya que ambas tienen esta capacidad.

7.6 Las proteínas Cys4p y Cys3p son esenciales para la respuesta a estrés oxidativo

Hasta hace poco se descubrió lo fundamental que es el ácido sulfhídrico para la respuesta a estrés oxidativo en las células. Cys3p y Cys4p juegan un papel relevante en esta regulación, ya que son una de las pocas enzimas que producen H₂S. Durante el estrés de retículo endoplásmico se producen naturalmente especies reactivas de oxígeno por el plegamiento de proteínas, por lo que la recuperación con ayuda de la cisteína podría igual ayudar a recuperarse de estrés oxidativo.

Para corroborar lo anterior se realizaron goteos en cajas de YPD adicionadas con la especie reactiva de oxígeno H₂O₂ a las concentraciones de 5 mM, 6 mM y 7 mM. En la figura 13 se observa que la cepas *cys4* Δ y *cys3* Δ son sensibles al estrés oxidativo, ya que desde la concentración más baja tienen una disminución en su crecimiento. En la concentración más alta, 7 mM, las cepas mutantes les cuesta crecer incluso en la primera gota, mientras que la cepa silvestre crece sin problemas hasta la tercera dilución. Esto nos podría hablar de que no es una presión demasiado fuerte, pero aún así la ausencia de estas dos proteínas es suficiente para que no crezcan las células.

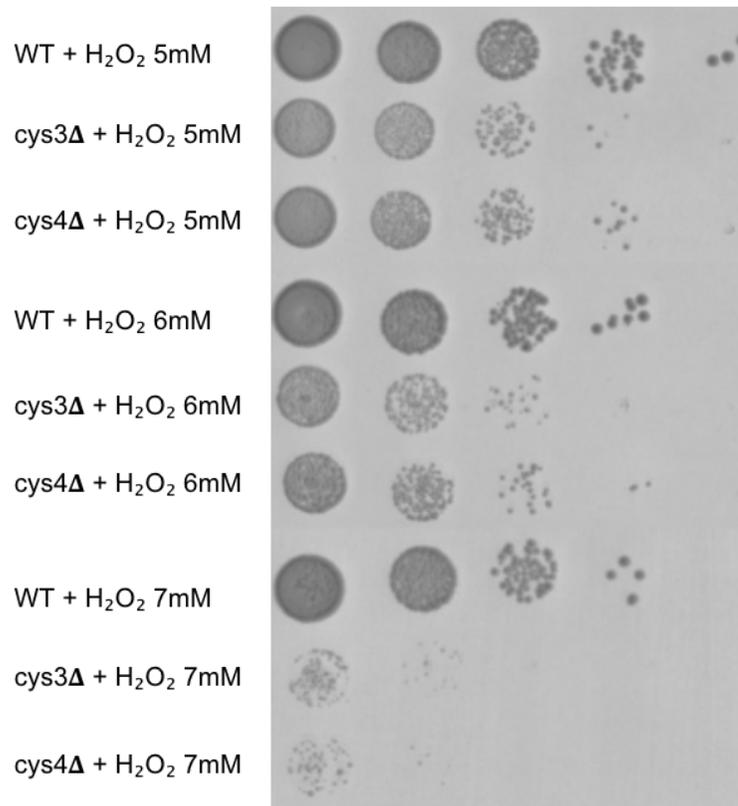


Figura 13. Sensibilidad a estrés oxidativo de las cepas cys4Δ y cys3Δ. Las cepas WT, cys4Δ y cys3Δ se cultivaron en medio con 5 mM, 6 mM y 7mM de H₂O₂. Ambas cepas mutantes son sensibles a H₂O₂.

Es de relevancia observar que parece ser que ambas proteínas tienen una sensibilidad parecida, a diferencia de los goteos con tunicamicina. El estrés oxidativo es un proceso generalizado y ocurre a todo lo largo de la célula, mientras que el estrés de retículo endoplásmico es un fenómeno particular de ese organelo. Esto nos podría estar indicando que durante el estrés de retículo endoplásmico la enzima generadora de H₂S Cys4p tuviera algún tipo de selectividad.

7.7 La adición de cisteína recupera el crecimiento de las células durante estrés oxidativo

Para observar si el mismo fenómeno de recuperación con cisteína ocurre durante el estrés oxidativo, se realizaron goteos con la combinación de H₂O₂ y de cisteína.

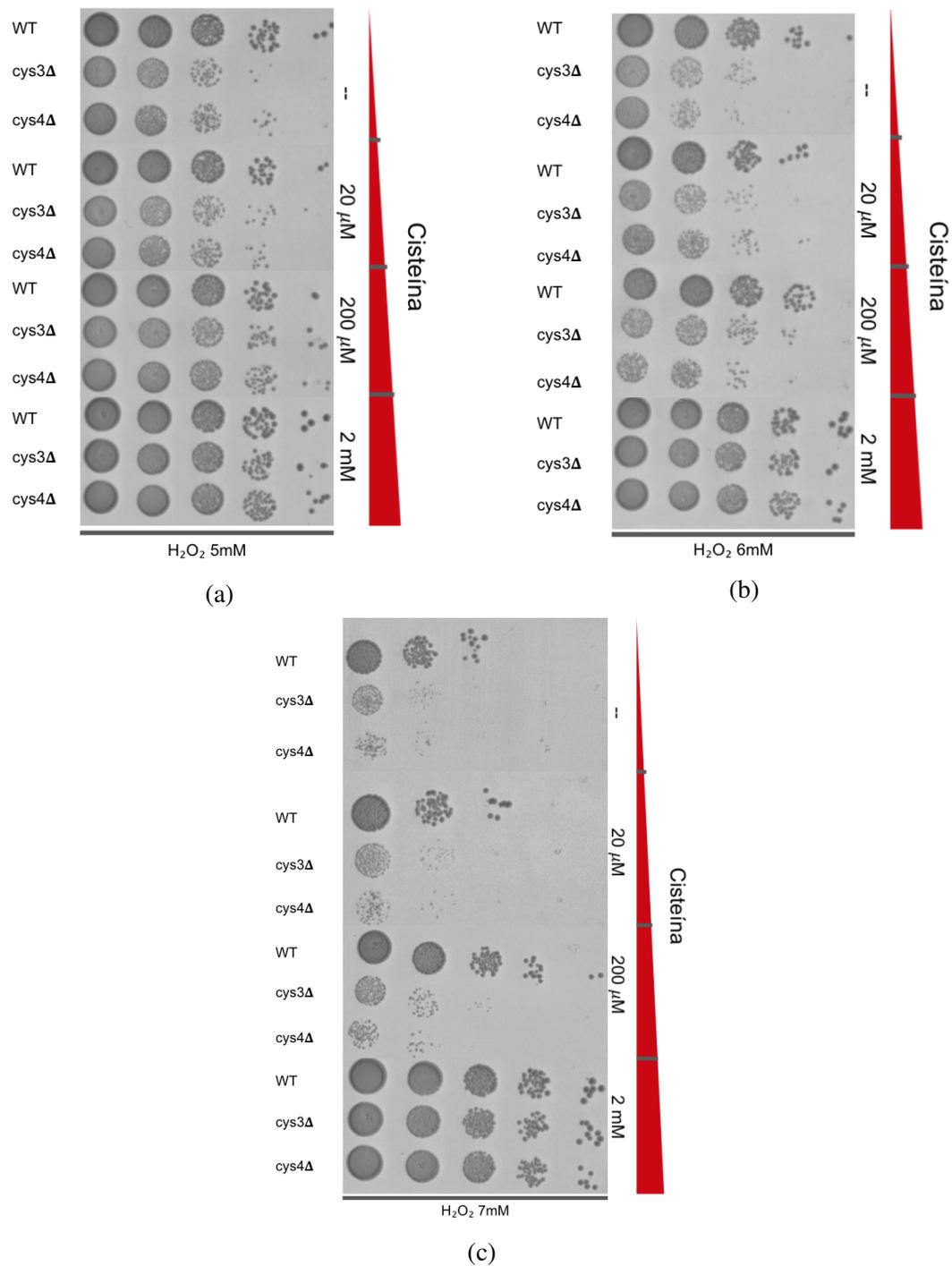


Figura 14. Recuperación del crecimiento bajo estrés oxidativo con la adición de cisteína. Las cepas WT, *cys4Δ* y *cys3Δ* se cultivaron en medio con 5 mM, 6 mM y 7mM de H_2O_2 y con 20 μ M, 200 μ M o 2 mM de cisteína. El crecimiento de ambas cepas mutantes se recupera al adicionar el medio con 2 mM de cisteína.

En la figura 14 se observa la recuperación del crecimiento de las cepas *cys4Δ* y *cys3Δ*

incluso en concentraciones de 7 mM de peróxido de hidrógeno. Esto nos lleva a pensar que tanto la proteína Cys3p como Cys4p podrían estar produciendo el H₂S necesario para la adaptación a estrés oxidativo a partir de la cisteína. Resulta interesante que en la concentración de cisteína 200 μ M se alcanza a observar que la cepa *cys3* Δ se recupera mejor que la cepa *cys4* Δ , pero es un efecto muy tenue. Con esto corroboramos que la cisteína también ayuda a reducir la sensibilidad por especies reactivas de oxígeno. La regulación de la actividad catalítica de estas enzimas es aún controversial, una de las teorías es la de selección por concentración de sustrato. En este caso se está agregando exogenamente un gran cantidad de cisteína (2 mM), por lo que se podría estar compitiendo por la enzima para producir H₂S.

7.8 Interacción genética entre *hac1* Δ y *cys4* Δ

Para ahondar más en el papel de la proteína Cys4p en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico, se seleccionó el principal factor de transcripción de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR): Hac1p. Una manera de observar si dos proteínas coinciden en alguna vía de señalización o ruta metabólica es buscando si existen interacciones genéticas entre los genes de dichas proteínas. Para observar si existen interacciones genéticas se realizan las mutantes de dichos genes individualmente, para posteriormente realizar la doble delección en un mismo fondo genético. Una vez obtenida la doble mutante, se analizan los fenotipos bajo condiciones específicas. Tras observar los fenotipos celulares, se comparan entre la doble mutante y las mutantes sencillas, de esta manera se puede observar si existe una interacción genética y si esta es positiva o negativa.

Para realizar lo anterior, se obtuvieron las cepas *hac1* Δ y *cys4* $\Delta*hac1* Δ . Se realizaron goteos con las mutantes sencillas y la doble para observar si es que existe una interacción genética entre estos dos genes. Al ser Hac1p el principal factor de transcripción de la UPR, su mutante es muy sensible a la inducción de estrés de retículo endoplásmico a través de tunicamicina, por lo que se probaron dos juegos de concentraciones del antibiótico.$

7.8.1 Concentraciones altas de tunicamicina

El primer juego de concentraciones de tunicamicina fue de concentraciones "altas" a las que la cepa *hac1Δ* apenas puede crecer: 0.2 $\mu\text{g/mL}$, 0.15 $\mu\text{g/mL}$ y 0.1 $\mu\text{g/mL}$. En la figura 15 se observa que únicamente en la concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ crecen las cepas *hac1Δ* y *cys4Δhac1Δ*. La cepa *cys4Δ* crece normalmente en 0.1 $\mu\text{g/mL}$ y en 0.15 $\mu\text{g/mL}$, pero a 0.2 $\mu\text{g/mL}$ ya empieza a mostrar sensibilidad.

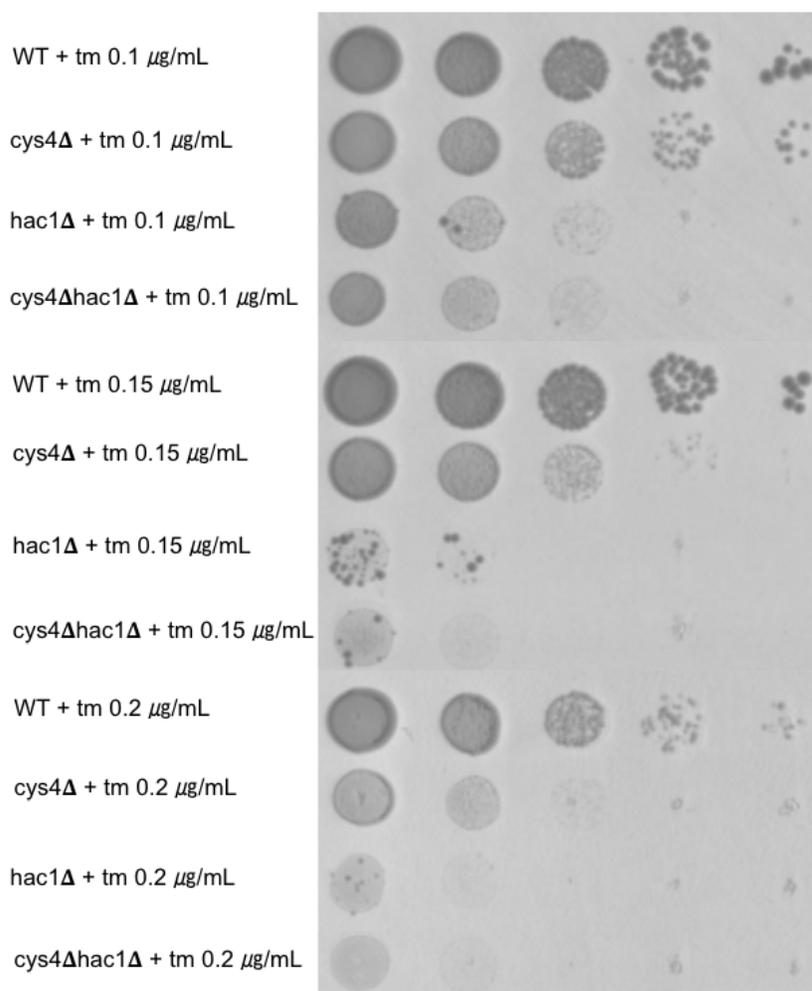


Figura 15. Sensibilidad a estrés de retículo endoplásmico de las cepas *cys4Δ*, *hac1Δ* y *cys4Δhac1Δ*. Las cepas WT, *cys4Δ*, *hac1Δ* y *cys4Δhac1Δ* se cultivaron en medio con 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 0.15 $\mu\text{g/mL}$ y 0.2 $\mu\text{g/mL}$ de tm. A concentraciones altas de tm la doble mutante es sensible.

Con estas concentraciones de tunicamicina es difícil evaluar si existe una interacción genética, aunque sirve para observar los cambios en las mutantes sencillas a concentraciones

más cercanas a las utilizadas anteriormente.

7.8.2 Concentraciones bajas de tunicamicina

El segundo juego de concentraciones de tunicamicina fueron "bajas" a las que la cepa *hac1Δ* crezca correctamente: 0.04 $\mu\text{g/mL}$, 0.06 $\mu\text{g/mL}$ y 0.08 $\mu\text{g/mL}$.

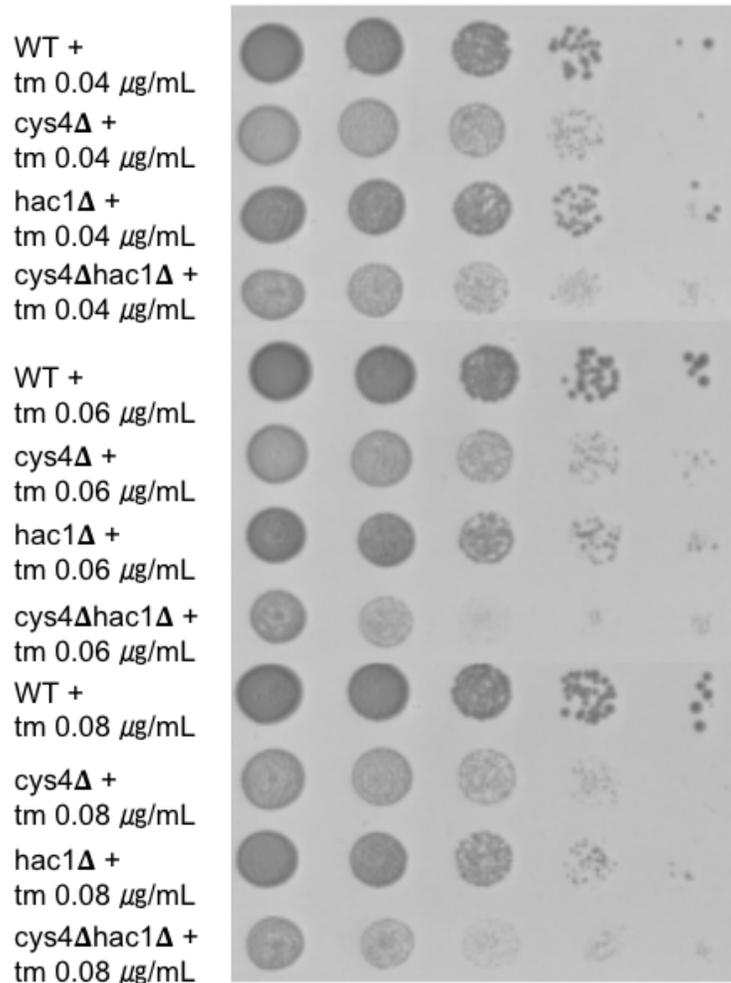


Figura 16. Sensibilidad a estrés de retículo endoplásmico de las cepas *cys4Δ*, *hac1Δ* y *cys4Δhac1Δ*. Las cepas WT, *cys4Δ*, *hac1Δ* y *cys4Δhac1Δ* se cultivaron en medio con 0.04 $\mu\text{g/mL}$, 0.06 $\mu\text{g/mL}$ y 0.08 $\mu\text{g/mL}$ de tm. En concentraciones bajas de tunicamicina se aprecia una posible interacción genética entre CYS4 y HAC1.

En la figura 16 se observa en estas concentraciones si crecen las cepas *hac1Δ* y *cys4Δhac1Δ*, y al mismo tiempo se esclarece el fenotipo de sensibilidad en las concentraciones de 0.06 $\mu\text{g/mL}$ y 0.08 $\mu\text{g/mL}$. Inesperadamente, a estas concentraciones de tunicamicina pareciera

que la cepa *cys4*Δ es más sensible que la cepa *hac1*Δ. Esto nos podría indicar que el mecanismo de acción de Cys4p en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico ocurre en los momentos tempranos de la adaptación. Por otro lado, se alcanza a ver que tal vez si exista una interacción genética entre estos dos genes, ya que el fenotipo de la doble mutante no tiene el crecimiento esperado. Al ser los goteos una técnica semi cuantitativa, es necesario la aplicación de otras técnicas cuantitativas más sensibles para establecer la interacción genética, sin embargo los goteos sirven para dar indicios, como en este caso, de dichas interacciones genéticas.

7.9 Cisteína cura el fenotipo de sensibilidad en *cys4*Δ, pero no en *hac1*Δ ni en *cys4*Δ*hac1*Δ

Se realizaron goteos con las concentraciones altas y bajas de tunicamicina y con cisteína para comprobar si también se podría curar el fenotipo de sensibilidad de la mutante sencilla *hac1*Δ y de la doble mutante *cys4*Δ*hac1*Δ. En las figuras 17, 18 y 19 se observan los goteos con las concentraciones altas de tunicamicina y las distintas de cisteína. En la concentración de 0.1 μg/mL hay una recuperación muy leve de la mutante sencilla y la doble, pero no llega a crecer la siguiente dilución. En las concentraciones de 0.15 μg/mL y 0.2 μg/mL tanto la cepa silvestre como la cepa *cys4*Δ recuperan el crecimiento al agregarles cisteína al 2 mM, pero ni la cepa *hac1*Δ ni *cys4*Δ*hac1*Δ se recuperan de la sensibilidad a tunicamicina. Lo anterior hace pensar que la acción de la cisteína ocurre río arriba de Hac1p en la respuesta a proteínas mal plegadas, ya que su efecto no sustituye al factor de transcripción.

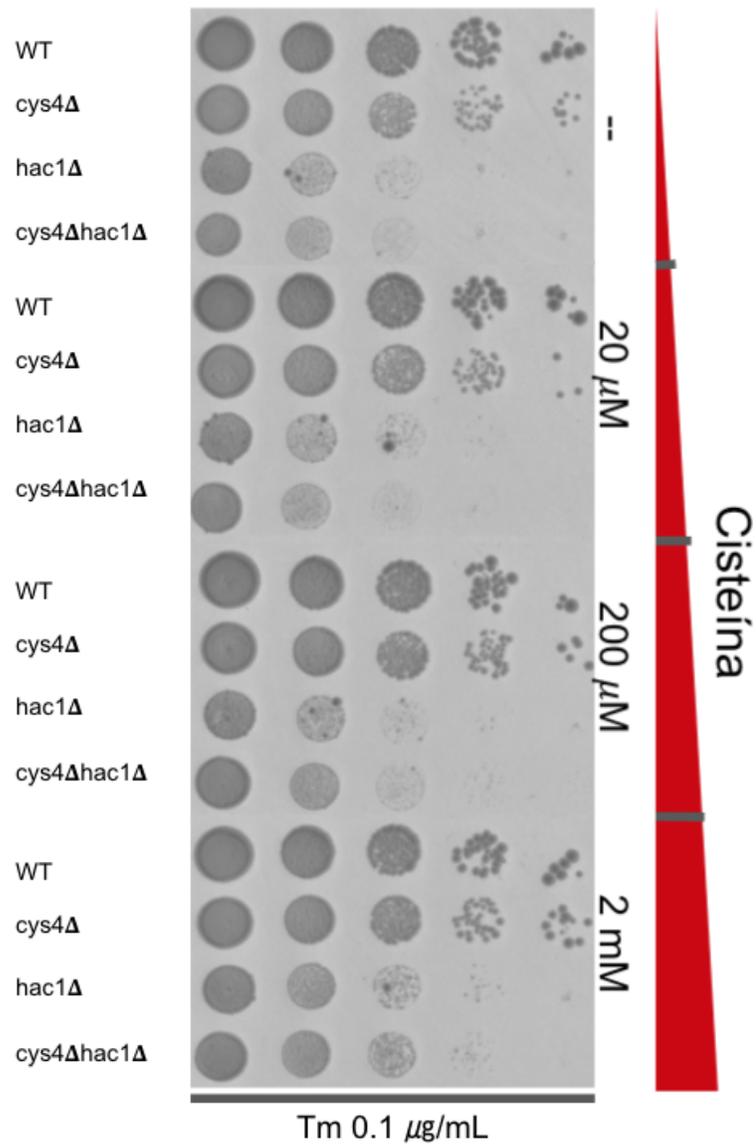


Figura 17. Recuperación de sensibilidad a tunicamicina 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las cepas WT, cys4 Δ , hac1 Δ y cys4 Δ hac1 Δ se cultivaron en medio con 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tm y con 20 μM , 200 μM o 2mM de cisteína. Las cepas hac1 Δ y cys4 Δ hac1 Δ no recuperan significativamente el crecimiento con la adición de cisteína.

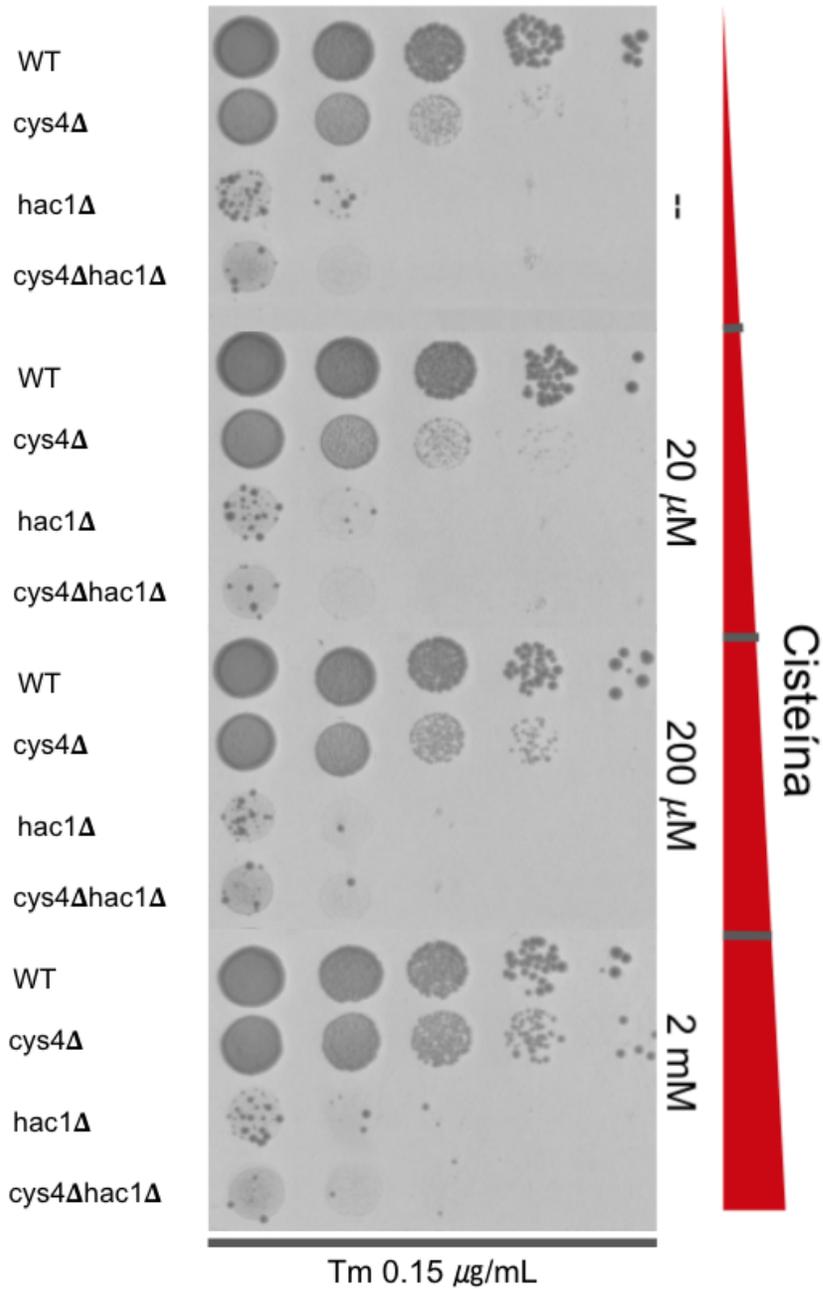


Figura 18. Recuperación de sensibilidad a tunicamicina 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las cepas WT, cys4 Δ , hac1 Δ y cys4 Δ hac1 Δ se cultivaron en medio con 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tm y con 20 μM , 200 μM o 2mM de cisteína. Las cepas hac1 Δ y cys4 Δ hac1 Δ no recuperan significativamente el crecimiento con la adición de cisteína.

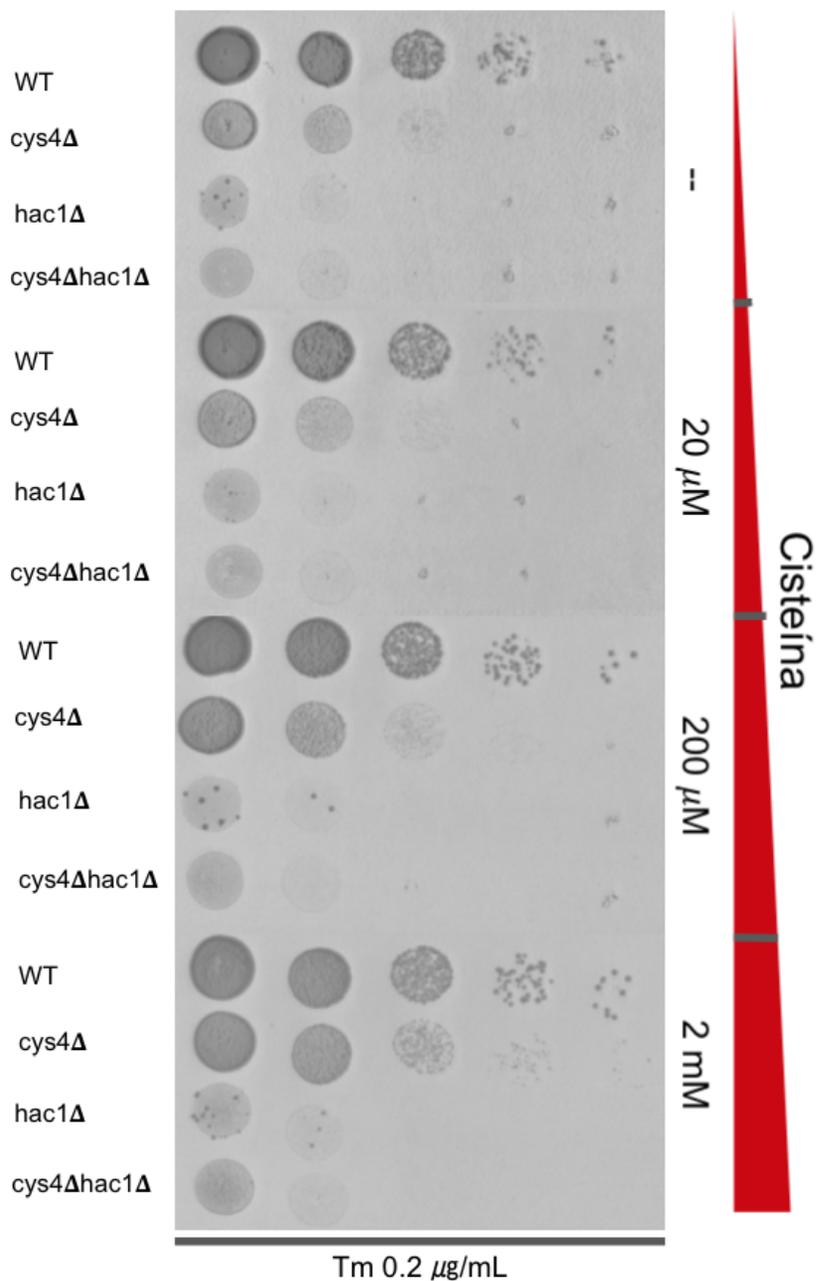


Figura 19. Recuperación de sensibilidad a tunicamicina 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las cepas WT, cys4 Δ , hac1 Δ y cys4 Δ hac1 Δ se cultivaron en medio con 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tm y con 20 μM , 200 μM o 2mM de cisteína. Las cepas hac1 Δ y cys4 Δ hac1 Δ no recuperan significativamente el crecimiento con la adición de cisteína.

En las figuras 20, 21, 22 se muestran los goteos con concentraciones bajas de tunicamicina y las ditintas de cisteína para corroborar lo encontrado en las concentraciones altas. De nuevo la cepa *cys4* Δ tiene una mayor sensibilidad que la cepa *hac1* Δ a concentraciones bajas de 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pero al agregar cisteína el crecimiento de la cepa crece al mismo nivel que la cepa silvestre.

En la concentración 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tunicamicina, la cepa *hac1* Δ crece normalmente como la cepa silvestre, sin embargo, la doble mutante *cys4* Δ *hac1* Δ nunca alcanza el crecimiento normal de la cepa silvestre.

En la concentración 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tunicamicina, la doble mutante *cys4* Δ *hac1* Δ en un inicio muestra una sensibilidad marcada, ya que solo crece hasta su primera dilución, pero al agregarle cisteína 2 mM recupera el crecimiento de la cepa silvestre. Esto podría estar pasando ya que el crecimiento de la cepa *hac1* Δ nunca se ve disminuía, por lo que en este caso la sensibilidad es de la cepa *cys4* Δ a concentraciones bajas de tunicamicina.

En la concentración más alta, 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tunicamicina, la cepa *cys4* Δ muestra sensibilidad, pero recupera su crecimiento cuando se agrega cisteína. La cepa *hac1* Δ es sensible y, en concordancia con otros resultados, no recupera su crecimiento al agregarle cisteínas. La doble mutante *cys4* Δ *hac1* Δ en un inicio se muestra más sensible que la cepa *hac1* Δ , pero al agregarle cisteína recupera su crecimiento, sin embargo, nunca alcanza el crecimiento de la cepa silvestre y se mantiene como la cepa *hac1* Δ .

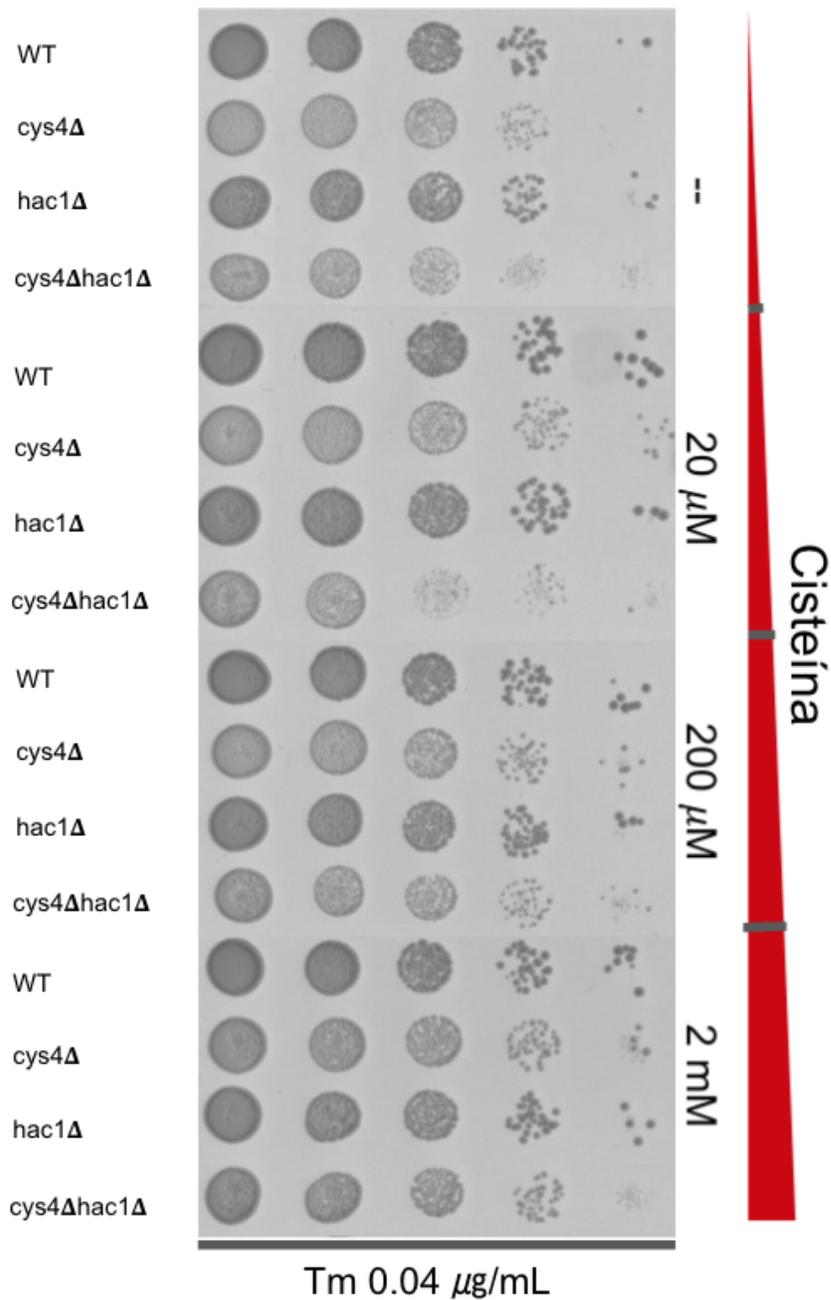


Figura 20. Recuperación de sensibilidad a tunicamicina 0.04 μg/mL. Las cepas WT, *cys4Δ*, *hac1Δ* y *cys4Δhac1Δ* se cultivaron en medio con 0.04 μg/mL de tm y con 20 μM, 200 μM o 2mM de cisteína. La cepa *cys4Δhac1Δ* no recupera significativamente el crecimiento con la adición de cisteína.

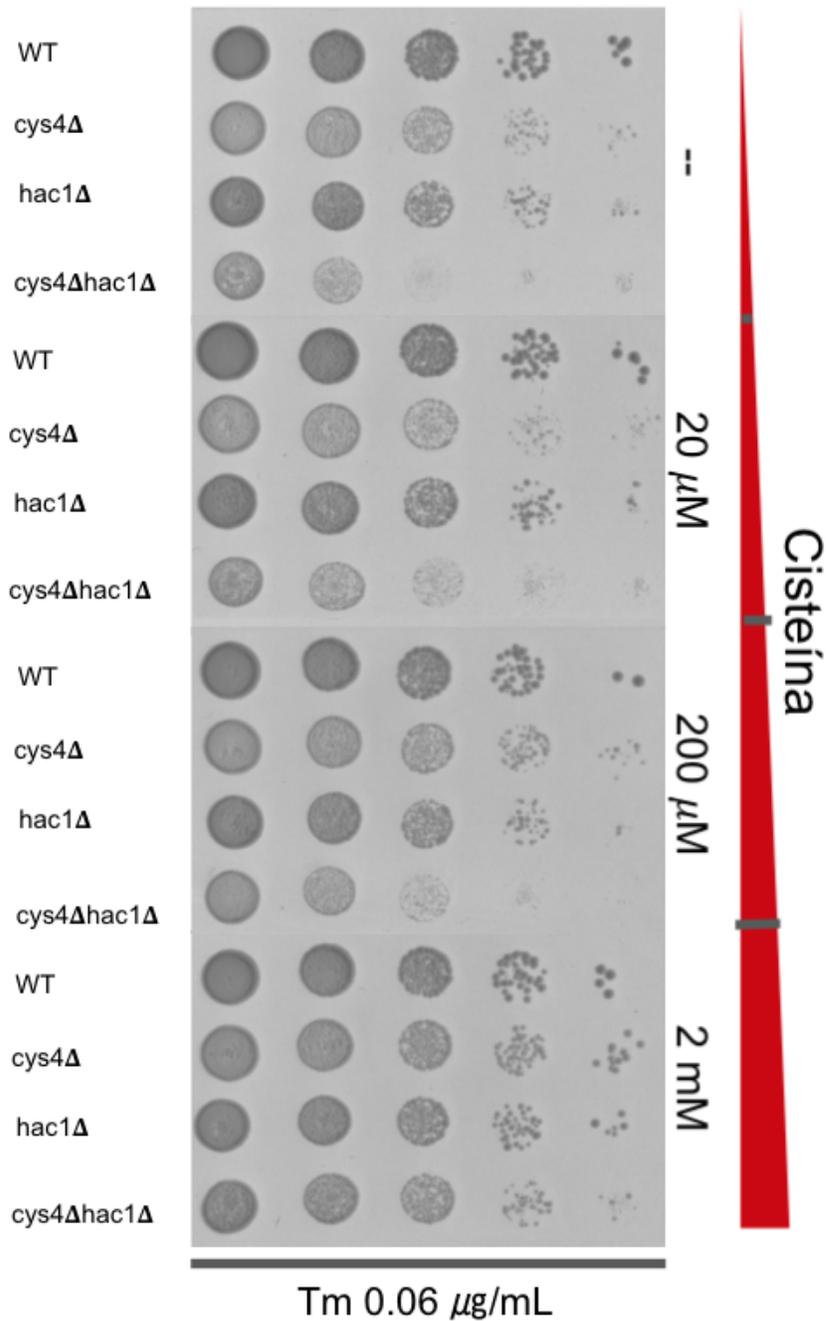


Figura 21. Recuperación de sensibilidad a tunicamicina 0.06 μg/mL. Las cepas WT, *cys4Δ*, *hac1Δ* y *cys4Δhac1Δ* se cultivaron en medio con 0.06 μg/mL de tm y con 20 μM, 200 μM o 2mM de cisteína. La cepa *cys4Δhac1Δ* no recupera significativamente el crecimiento con la adición de cisteína.

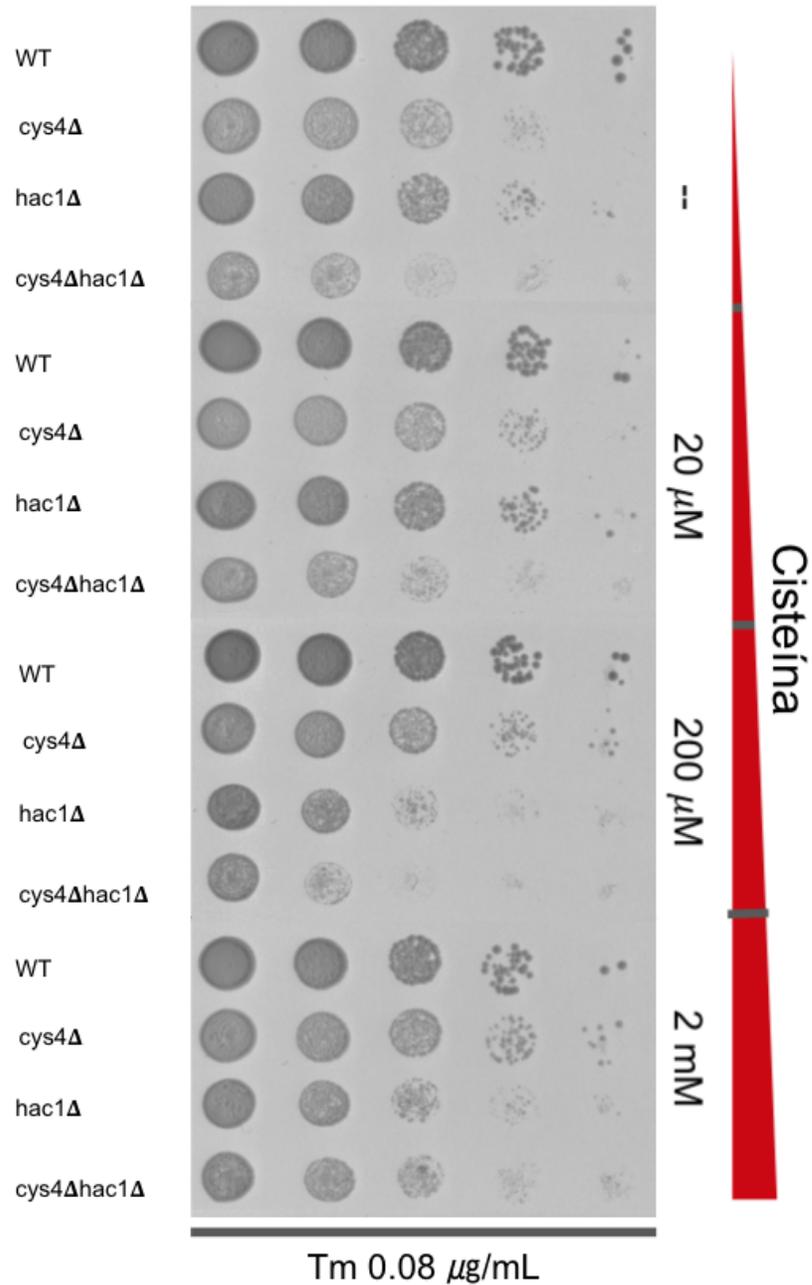


Figura 22. Recuperación de sensibilidad a tunicamicina 0.06 μg/mL. Las cepas WT, cys4Δ, hac1Δ y cys4Δhac1Δ se cultivaron en medio con 0.06 μg/mL de tm y con 20 μM, 200 μM o 2mM de cisteína. Las cepas hac1Δ y cys4Δhac1Δ no recuperan significativamente el crecimiento con la adición de cisteína.

7.10 Interacción genética entre los genes *CYS4* y *HAC1*

7.10.1 Interacción en medio de crecimiento YPD

Una de las mejores maneras de comprobar la interacción entre dos genes es realizando una cinética de crecimiento para visualizar en tiempo real la replicación de las células. Por lo tanto, para corroborar los indicios de una interacción genética encontrados en los goteos, se realizó la cinética de crecimiento de la cepa silvestre, la cepa *cys4* Δ , la cepa *hac1* Δ y la doble mutante *cys4* Δ *hac1* Δ , siguiendo el protocolo establecido en la sección de material y métodos. Se siguió en tiempo real durante 48 horas el crecimiento de las cepas antes mencionadas para obtener la curva de crecimiento que se observa en la figura 23, una curva tradicional de tres fases de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; fase lag, fase log y fase estacionaria, sin tener aquí la fase de senescencia.

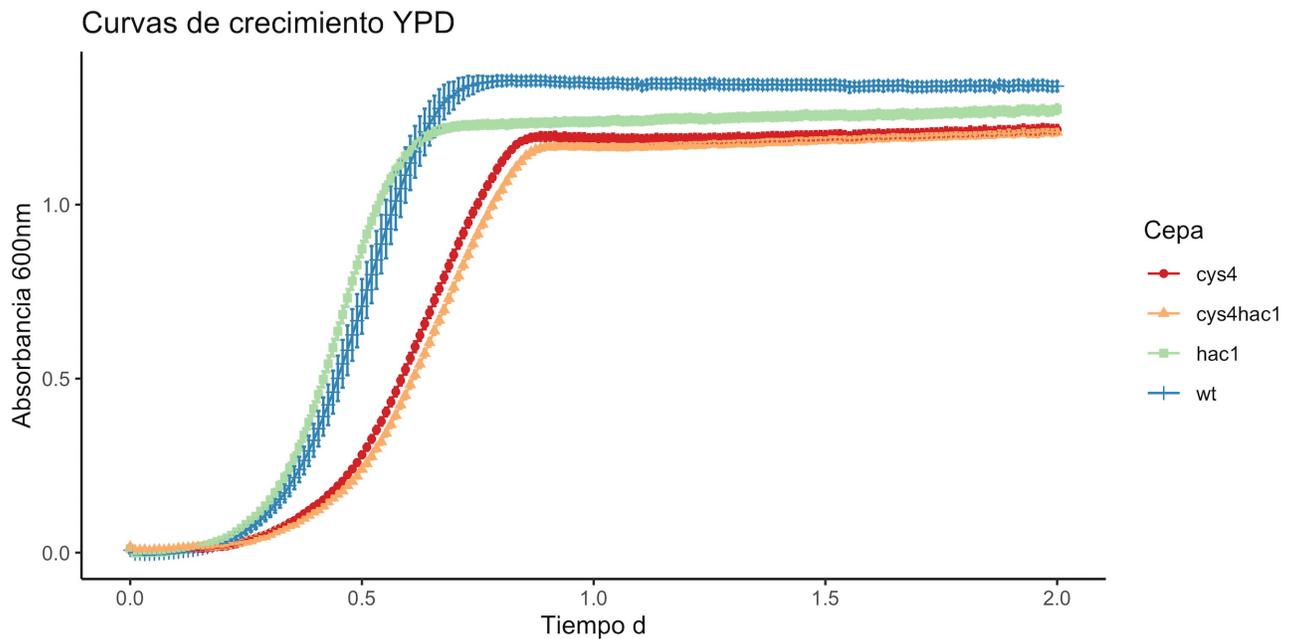


Figura 23. Interacción genética entre los genes *CYS4* y *HAC1*. El fenotipo de crecimiento de la doble mutante *cys4* Δ *hac1* Δ es menos apto que lo esperado, ya que la fase lag de crecimiento es menor que la suma de las mutantes sencillas.

El análisis de los fenotipos de crecimiento para la comprobación de la interacción genética se da durante la fase de crecimiento lag, el centro de la curva sigmoidea. En la figura 23 se observa que la cepa *hac1Δ* tiene un fenotipo levemente más apto que la cepa silvestre, mientras que la cepa *cys4Δ* tiene un fenotipo de crecimiento acentuadamente menos apto que la cepa silvestre. Analizando el fenotipo de crecimiento de la doble mutante *cys4Δhac1Δ*, este debería de ser la suma de los fenotipos de las mutantes sencillas si no existiera interacción genética alguna. Observando la figura 23 se puede afirmar que la cepa *cys4Δhac1Δ* tiene un fenotipo de crecimiento menos apto que el esperado, por lo que se concluye que existe una interacción genética negativa entre ambos genes. Lo anterior, aunado a lo encontrado en los distintos goteos con cisteína y peróxido de hidrógeno, nos hace concluir que posiblemente la producción de H₂S a partir de la degradación de cisteína específicamente por Cys4p es esencial para la respuesta a proteínas mal plegadas y este es independiente del factor de transcripción Hac1p, por lo que la regulación podría estar ocurriendo río arriba de la UPR.

7.10.2 Interacción en medio de crecimiento YPD adicionado con tunicamicina

Para observar si la interacción genética durante condiciones de estrés de retículo endoplásmico y para corroborar el fenotipo de sensibilidad de la cepa *cys4Δ* en concentraciones bajas de tunicamicina, se realizó la cinética de crecimiento en medio líquido de YPD adicionado con tunicamicina. Se realizaron las cinéticas con las concentraciones de tunicamicina de 0.5 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo, el crecimiento de las cepas fue casi nulo. Esto ocurrió ya que en medio líquido, a diferencia del medio sólido, el antibiótico se encuentra en mayor biodisponibilidad, ya que las cepas están en constante interacción con el medio. Por lo tanto, fue necesario estandarizar la concentración de tunicamicina en el que las cepas mutantes crecieran lo suficiente para observar las diferencias en el crecimiento. En la figura 24 se observa la prueba de crecimiento a distintas concentraciones de tunicamicina. Como se puede observar, en la concentración de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ no crece correctamente ninguna de las cepas utilizadas. En la concentración de 0.02 $\mu\text{g/mL}$ crecen todas las cepas, sin embargo la cepa *cys4Δhac1Δ* tiene una acentuada sensibilidad al crecimiento. Cuando se utilizó la concentración 0.01 $\mu\text{g/mL}$ todas las cepas crecen correctamente después de 48 horas de incubación.

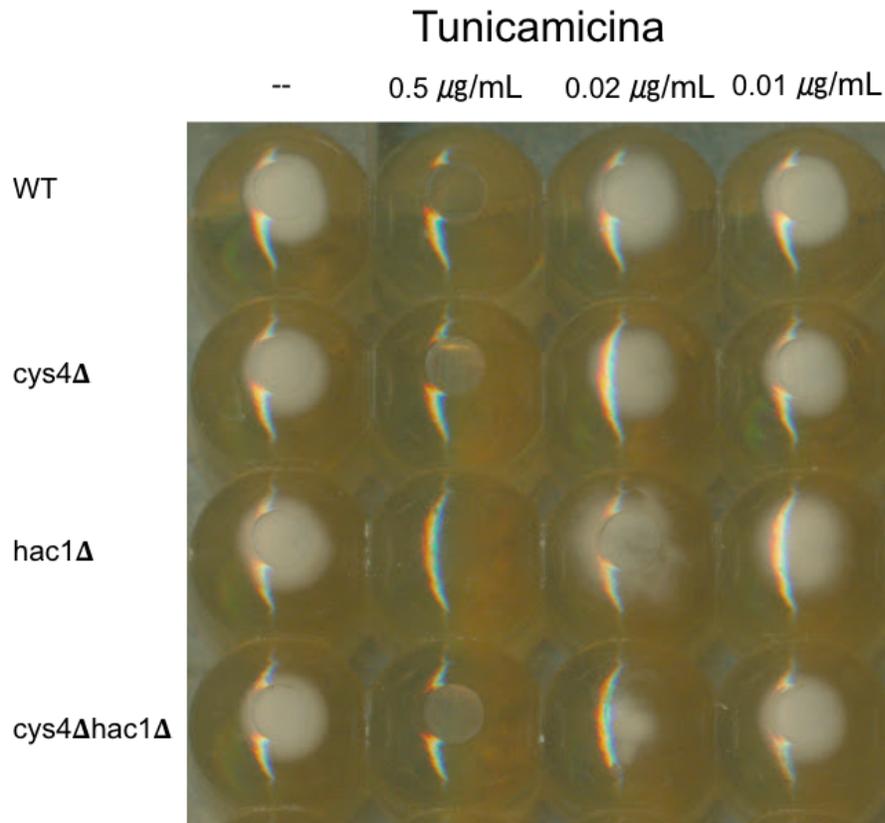


Figura 24. Prueba de crecimiento en medio líquido YPD adicionado con tunicamicina. Se cultivaron las cepas WT, cys4 Δ , hac1 Δ y cys4 Δ hac1 Δ en YPD líquido adicionado con las concentraciones 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 0.02 $\mu\text{g/mL}$ y 0.01 $\mu\text{g/mL}$.

Una vez estandarizado las concentraciones correctas para el crecimiento de todas las cepas en YPD adicionado de tunicamicina en medio líquido, se realizaron las cinéticas de crecimiento de estas cepas. En la figura 25 se muestran las curvas de crecimiento en medio YPD líquido adicionado con tunicamicina 0.01 $\mu\text{g/mL}$. Se observa que tanto la cepa silvestre como la cepa hac1 Δ crecen casi idénticamente a cuando no se adiciona tunicamicina, sin embargo, si existe una leve sensibilidad en el crecimiento de la segunda. Por otro lado, tanto la cepa cys4 Δ como la cepa cys4 Δ hac1 Δ tienen un fenotipo de crecimiento mas lento que comparándolas con su crecimiento en la figura 23. Ambas cepas terminan su crecimiento de fase lag en un poco mas de 24 horas de incubación. Con respecto a la interacción genética, se corroboró la existencia de una interacción genética a concentraciones bajas de tunicamicina. Por otro lado, se corroboró también lo encontrado en los goteos de una mayor sensibilidad

de la cepa *cys4* Δ que la cepa *hac1* Δ a concentraciones bajas de tunicamicina.

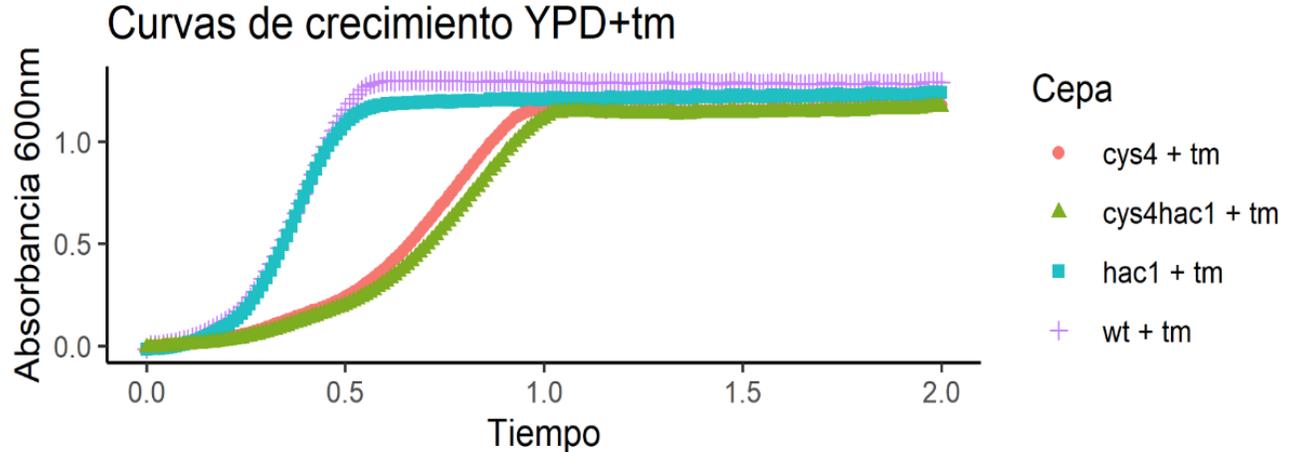


Figura 25. Interacción genética entre los genes *CYS4* y *HAC1* durante estrés de retículo endoplásmico. El fenotipo de crecimiento de la doble mutante *cys4* Δ *hac1* Δ es menos apto que lo esperado, ya que la fase lag de crecimiento es menor que la suma de las mutantes sencillas durante estrés de retículo endoplásmico. Sensibilidad de la mutante del gen *CYS4* en concentraciones bajas de tunicamicina (0.01 μ g/mL).

7.11 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos

Se realizó el alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre cistationia β -sintasa de humano y de levadura para observar los distintos grados de conservación entre los homólogos de esta proteína. Además, este tipo de análisis nos permite identificar posibles mecanismos de regulación, entre otros, que podrían estar compartidos entre dos especies, como por ejemplo las modificaciones post-traduccionales en las proteínas, con la limitante de que no podemos observar tridimensionalmente la interacción de los residuos. En la figura 26 encontramos el resultado del alineamiento. La primera diferencia que encontramos entre ambas proteínas es que CSB de humanos es una proteína más grande, sin embargo, encontramos que hay una conservación hasta del 43% de los residuos, más un porcentaje importante de conservación en residuos diferentes, pero con propiedades fisicoquímicas parecidas.

En el recuadro negro se encuentra señalada la única cisteína de Cys4p ubicada en el residuo 301. Como podemos observar esa cisteína no se encuentra conservada en la proteína de humanos, sin embargo la última cuenta con otras 11 cisteínas, lo que nos lleva a pensar

posibilidad de un mecanismo regulatorio compartido.

7.12 Análisis de la estructura tridimensional

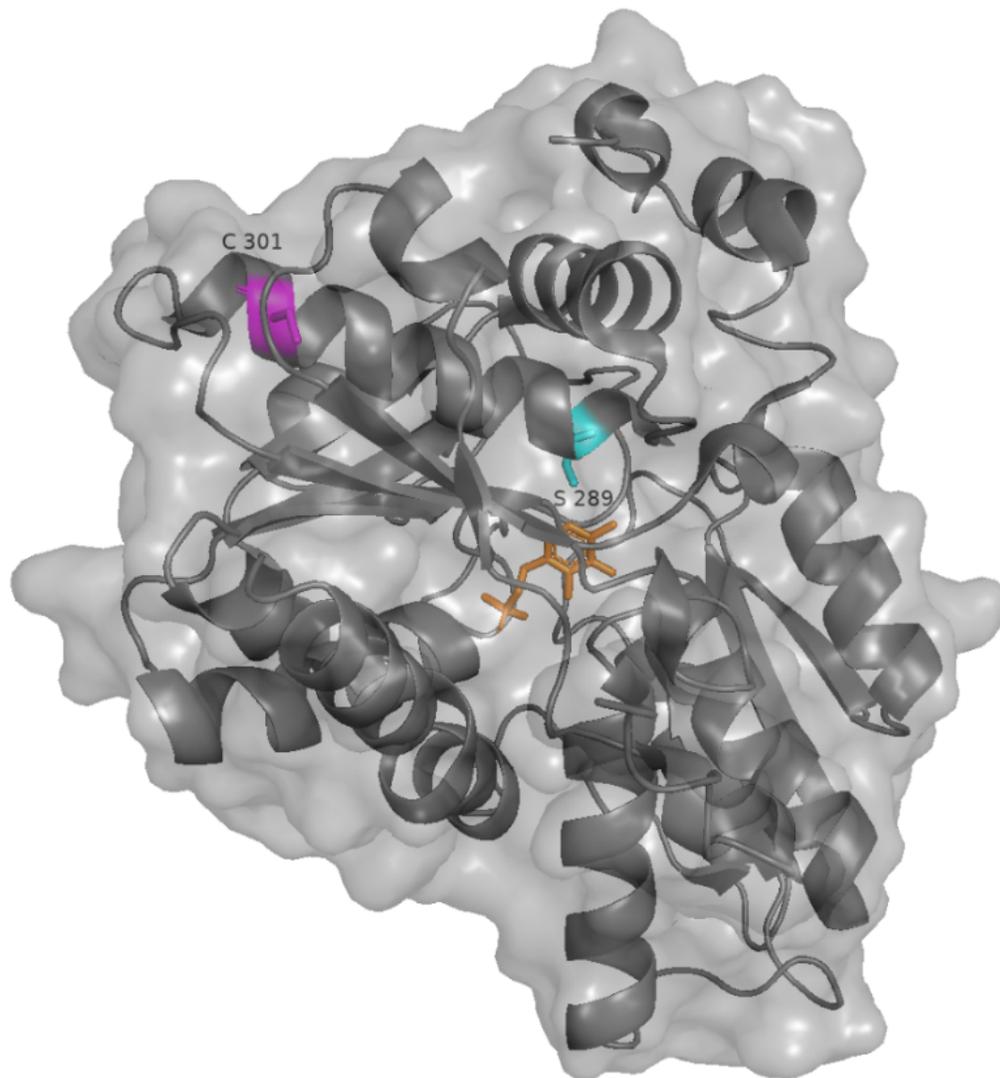


Figura 27. Estructura cristalográfica de Cys4p.

Se analizó el cristal 6C2Z correspondiente a la proteína Cys4p en su estado de unión a PLP. Como podemos observar en la Figura 27, Cys4p es una proteína globular y en su sitio catalítico encontramos una molécula de PLP (en naranja), cofactor necesario para su actividad. Interesantemente, encontramos a su cisteína 301 (C301, en magenta) y su serina

289 (S289, en cian) en una misma estructura secundaria, una alfa helice, lo que nos podría indicar una relación en la regulación global de la proteína. La C301 se encuentra expuesta en la superficie de la proteína lo que la vuelve posible blanco de interactores, ya sea cisteínas de otras proteínas o agentes que causen PTMs en ella, como el H₂O₂ y el H₂S.

Por otro lado, se observa que la S289 (en cian) se encuentra en cercanía a la molécula de PLP (en naranja), formando parte del sitio catalítico de Cys4p. En la figura 28 se destaca que la S289 está entre 3.4-2.7 armstrongs de distancia del anillo aromático de la molécula de PLP. Anteriormente se ha descrito que esta serina en su estado nativo interactúa directamente con la molécula de PLP y su sustitución por un D modifica las cargas que interactúan, inhibiendo así la unión a PLP y por ende la actividad catalítica canónica de esta enzima(51). Resulta de particular interés que la sustitución fuera por un ácido glutámico, ya que se ha reportado este aminoácido como uno fosfomimético (52).

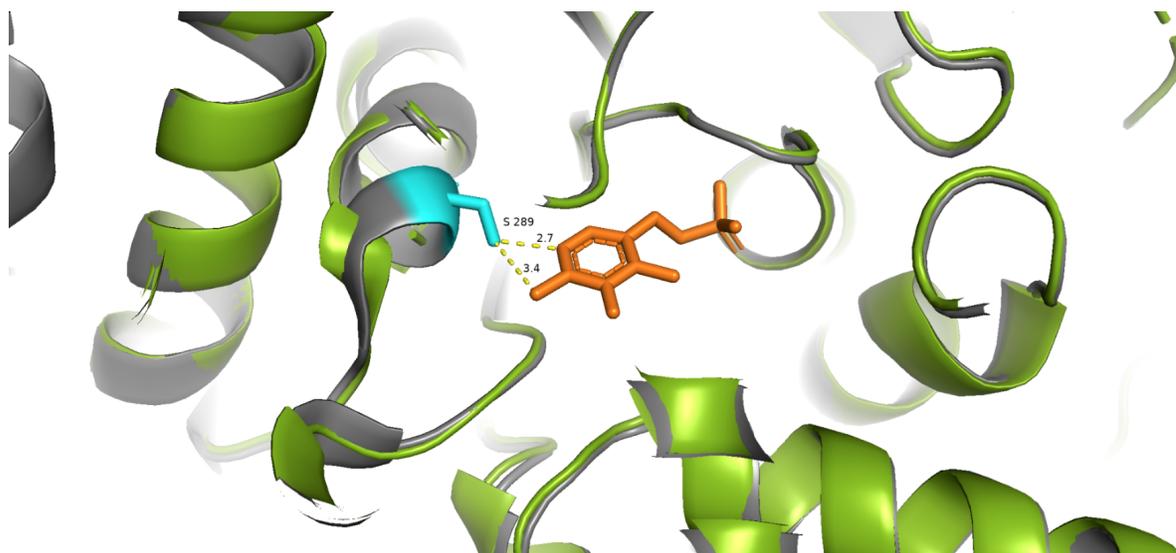


Figura 28. Acercamiento al sitio catalítico de Cys4p. Se señala la serina 289, el cofactor PLP y la distancia entre ambos.

En complemento con el alineamiento de la secuencia lineal, se realizó el alinamiento de las estructuras tridimensionales de la cistationina β -sintasa de *Saccharomyces cerevisiae* (color gris) y de *Homo sapiens* (color verde).

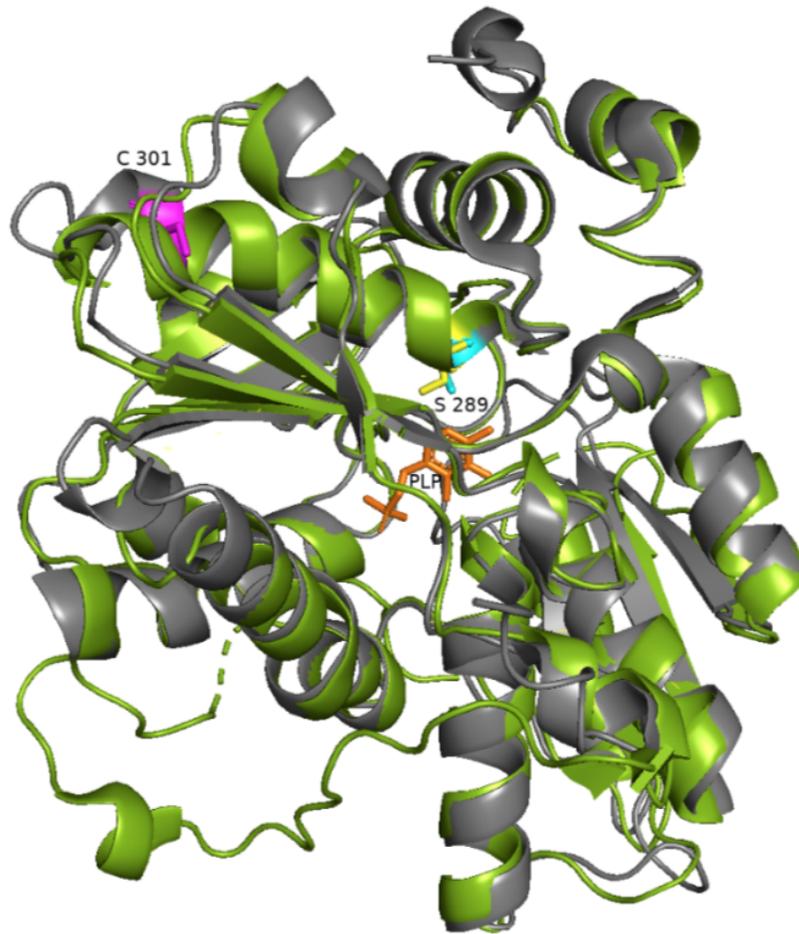


Figura 29. Alineamiento de las estructuras de Cys4p y CSB.

En la figura 29 se observa que, si bien en la secuencia lineal existía alrededor del 43% de conservación, en el alineamiento de las estructuras se conservan la gran mayoría de las estructuras secundarias y la estructura global de la proteína. La C301 (en magenta) se encuentra ausente en la proteína de humanos y se relaciona con un quiebre al inicio de la alfa helice. Por otro lado, la S289 de levadura y la S349 de humano se encuentran exactamente en la misma posición, probablemente porque la interacción de esa serina con la molécula de PLP es esencial para la actividad catalítica canónica y se ha conservado a lo largo de la evolución. Anteriormente se ha descrito que la mutación de la S349 en humanos por una asparagina (N) inhibe la actividad canónica de CBS e inhibe la formación de estructuras cuaternarias multimericas (53).

Por todo lo anterior surge la importancia de estudiar el papel de estos residuos de aminoácidos sujetos a PTMs en la actividad alterna de Cys4p, ya que podría ser un proceso conservado en organismos metazoa como el ser humano.

7.13 Mutagénesis direccionada

Se realizaron mutaciones puntuales en la proteína Cys4p para obtener información acerca del papel que juegan el residuo de serina 289 y el de cisteína 301 en la regulación de su actividad. La primera mutación fue la sustitución de la serina 289 por un ácido glutámico, lo que inhibiría la actividad catalítica canónica de Cys4p. Las posteriores mutaciones realizadas fueron la sustitución de la cisteína 301 por serina C301S y por tirosina C301Y. La primera mutante apagaría la regulación redox, ya que no existiría el grupo tiol ($-SH$) que interactuaría con agentes oxidantes (H_2O_2 y H_2S). La segunda mutación simula la oxidación del grupo tiol ($-SOH$), pero impide la formación de puentes disulfuro con otra cisteína y la formación de grupos persulfuro ($-SSH$).

Se obtuvieron bacterias con el plásmido de cada mutación puntual según lo descrito en las secciones 6.8 y 6.9 de este trabajo. Para la confirmación de que las mutaciones puntuales se dieron de manera correcta, primero se aseguro que la recircularización del plásmido y su transformación en la bacterias ocurriera de manera correcta. Esto se hizo a través de la digestión del plásmido con las enzimas de restricción EcoRV y XbaI. Para esto se realizó una simulación previa utilizando el programa Serial Cloner que se observa en la figura 30.

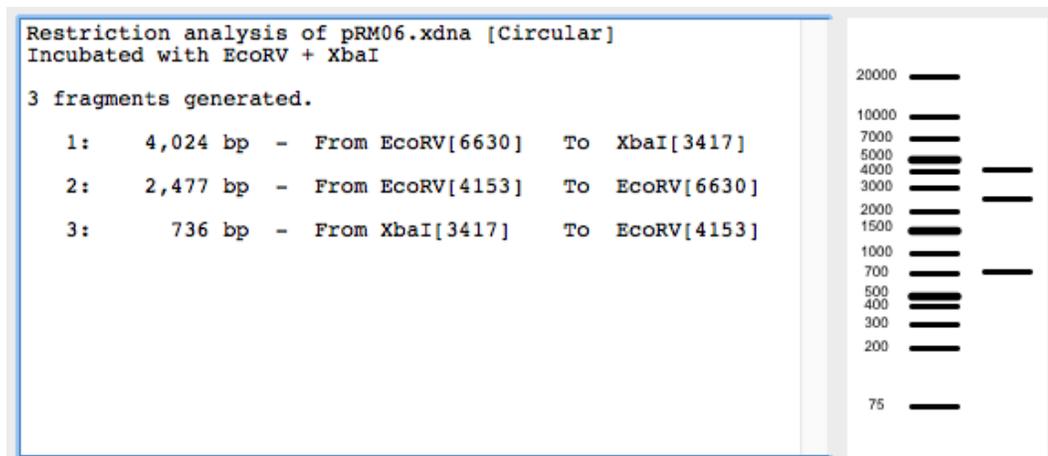
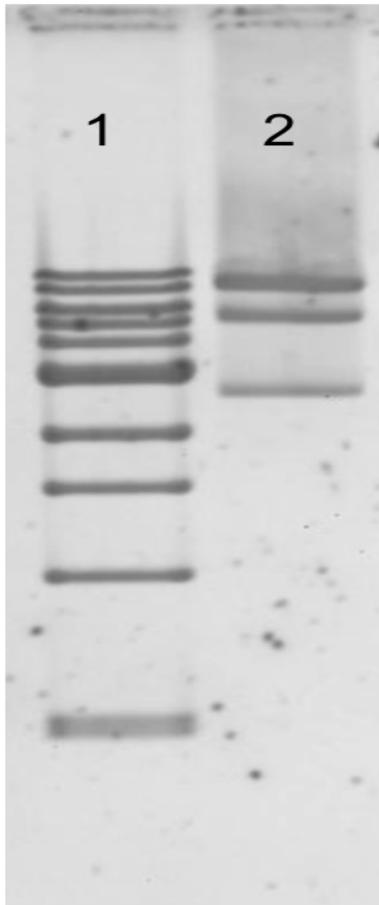


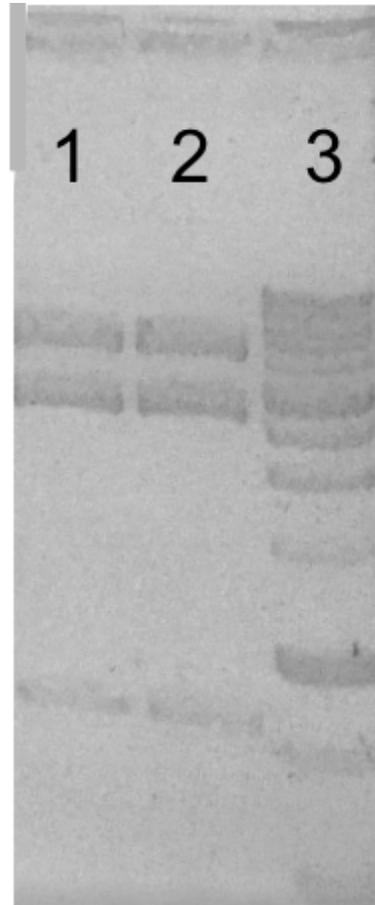
Figura 30. Simulación de la digestión del plásmido pRM06. Se muestran los fragmentos esperado de cortar al plásmido pRS416 con las enzimas de digestión XbaI y EcoRV. Se esperan 3 bandas de 4024, 2477 u 735 pares de bases.

Los fragmentos obtenidos a partir de la digestión del plásmido pRMV06 con las enzimas serán de 4,024 pb, 2,477 pb y 736 pb. Las digestiones se dejaron incubando durante toda la noche y, posteriormente, se visualizaron a través de un gel de agarosa al 0.8%. En la figura 31 se observan los gels de las 3 mutaciones puntuales. En el inciso a) se tiene en el carril 1 el marcador de peso molecular y en el carril 2 la muestra del plásmido con la mutación S289D. Se observan 3 bandas correspondientes a los tamaños esperados por la simulación. En el inciso b) se tiene en el carril 3 el marcador de peso molecular, en el carril 1 la muestra del plásmido con la mutación C301S y en carril 2 la muestra del plásmido con la mutación C301Y. Se observan 3 bandas correspondientes a los tamaños esperados por la simulación.

De esta manera se confirmó que los plásmidos sobre los que se realizaron las mutaciones puntuales se recircularizaron y se transformaron en las células de bacteria satisfactoriamente. Para confirmar que las mutantes puntuales ocurrieron exactamente en los codones de interés, se realizó la secuenciación de los plásmidos confirmados por digestión enzimática.



(a) S289D



(b) C301S y C301Y

Figura 31. Geles de agarosa de la digestión del plásmido pRMV06 con las mutaciones puntuales. a) En el carril 2 se tiene la digestión del plásmido que contiene la mutación S289D. b) En los carriles 1 y 2 se tienen las digestiones de los plásmidos que contienen las mutaciones C301S y C302Y respectivamente.

La secuenciación de los plásmidos se llevó a cabo en la Unidad de Biología Molecular (UBM) del Instituto de Fisiología Celular. La secuenciación de los plásmidos se realizó con el oligonucleótido antisentido Cys4B. El oligonucleótido Cys4B corresponde a la secuencia complementaria de 20 nucleótidos río abajo del codón a mutar. En la figura 32 se observa el cromatograma obtenido de la región a mutar y en la figura 33 el alineamiento de la secuencia original y la que sufrió la mutación.

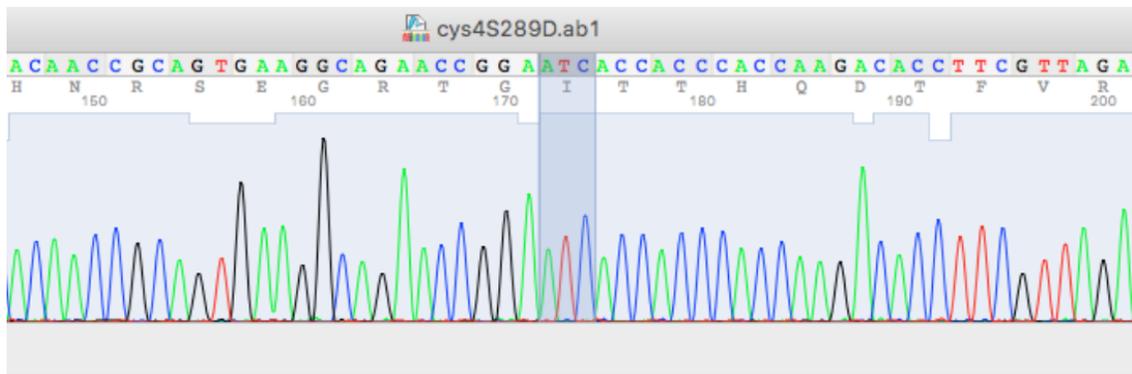


Figura 32. Cromatograma de la secuenciación del plásmido S289D. Fragmento del cromatograma de la secuenciación donde se resalta el codón donde ocurrió la mutación puntual.

```

Seq_1  279  CTCAGGTTTTGGACAGAAAATTAATTGATGTTTGGTATAAGACAGACGACAAGCCTTCTT  220
          |||
Seq_2  4199  CTCAGGTTTTGGACAGAAAATTAATTGATGTTTGGTATAAGACAGACGACAAGCCTTCTT  4258

Seq_1  219  TCAAATACGCCAGACAATTGATTTCTAACGAAGGTGTCTTGGTGGGTGGTGAATCCGGTT  160
          |||
Seq_2  4259  TCAAATACGCCAGACAATTGATTTCTAACGAAGGTGTCTTGGTGGGTGGTGAATCCGGTT  4318

Seq_1  159  CTGCCTTCACTGCGGTTGTGAAATACTGTGAAGACCACCCTGAACTGACTGAAGATGATG  100
          |||
Seq_2  4319  CTGCCTTCACTGCGGTTGTGAAATACTGTGAAGACCACCCTGAACTGACTGAAGATGATG  4378
  
```

Figura 33. Alineamiento de la secuencia original del gen CYS4 con la secuencia de la mutante S289D. Hay un perfecto alineamiento de toda la secuencia aledaña al codón a mutar. Los dos nucleótidos que diferencian a una serina de un ácido glutámico en levadura se ven de color verde.

En la región seleccionada del cromatograma se observa el cambio de la secuencia complementaria natural AGA que codifica para el aminoácido serina por la secuencia ATC, secuencia que es complementaria al codón preferencial de *Saccharomyces cerevisiae* para el ácido glutámico GAT. En el alineamiento se observa en color verde el cambio de nucleótidos y en morado el oligonucleótido Cys4B con el que se realizó la secuenciación. Ningún otro nucleótido sufrió mutaciones espontáneas durante el proceso. Con esto comprobamos que las mutaciones puntuales ocurrieron satisfactoriamente y así se obtuvieron las mutantes de Cys4p S289D, C301S y C301Y.

7.14 La mutación en S289D no altera la respuesta a estrés de retículo endoplásmico

Se realizaron goteos en medio YPD más tunicamicina a las concentraciones 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con las cepas siguientes:

- *WT* + pRS416 (Cepa silvestre con el vehículo vacío basado en el plásmido pRS416)
- *cys4* Δ + VV (Cepa *cys4* Δ con el vehículo vacío)
- *cys4* Δ + *cys4* (Cepa *cys4* Δ con el gen *CYS4* restituido)
- *cys4S289D* (Cepa con la mutante puntual S289D)
- *cys4carbP* (Cepa *CYS4* sin el extremo carboxilo en plásmido monocopia)
- *cys4carbY* (Cepa *CYS4* sin el extremo carboxilo en plásmido multicopia)

Se ha reportado anteriormente que en la proteína de humanos CBS (homóloga de Cys4p) el extremo carboxilo de la proteína funciona como un represor halosterico, por lo que en el laboratorio se modificó de la misma manera a Cys4p en dos plásmidos; uno monocopia basado en pRS416 y uno multicopia basado en yEP352. En este caso se usaron como control, ya que la proteína Cys4p se mantiene constitutivamente activada.

En la figura 34 se observan los goteos de estas 6 cepas en las tres concentraciones de tunicamicina. En la concentración 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tunicamicina la cepa *cys4* Δ + VV muestra la sensibilidad normal que se ha descrito anteriormente en este estudio, pero interesantemente, la mutante S289D también muestra sensibilidad al compararla con la cepa silvestre o con la cepa *cys4* Δ + *cys4*. Lo anterior se ve acentuado entre mayor es la concentración de cisteína, en la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tunicamicina la mutante S289D crece unicamente hasta la segunda dilución, pero crece más que la cepa *cys4* Δ + VV. Esto podría darse ya que las serinas cercanas al cofactor PLP y al sitio catalítico son importantes para la selectividad del sustrato en esta familia de proteínas (56), por lo que esta mutante de Cys4p podría estar

prefiriendo a la cisteína y no a su sustrato canónico.

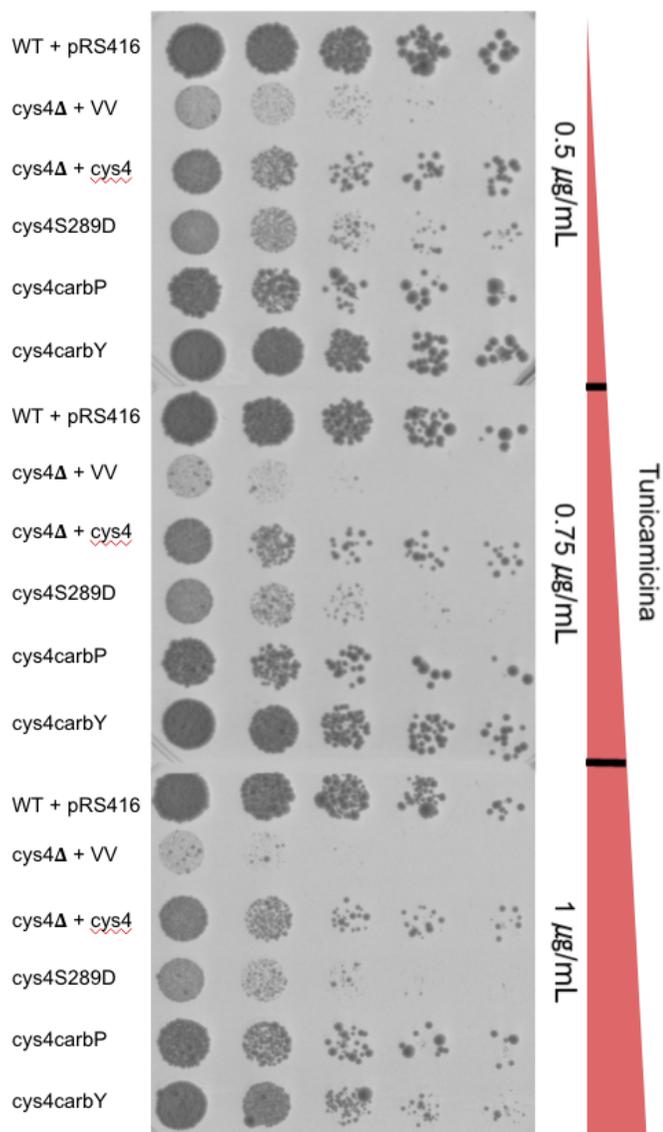


Figura 34. Efecto del estrés de retículo endoplásmico en la mutante S289D. Las cepas WT + pRS416, cys4Δ + VV, cys4Δ + cys4S, cys4S289D, cys4carbP y cys4carbY se cultivaron en medio con 0.5 µg/mL, 0.75 µg/mL y 1 µg/mL de tm.

Las cepas cys4carbP y cys4carbY no se observa ninguna diferencia al respecto de la cepa silvestre, sin embargo si se observa un fenotipo de crecimiento más apto que la cepa cys4Δ + cys4 por lo que podríamos concluir que estas proteínas que están constitutivamente activas tienen un mejor rendimiento que la proteína silvestre. La diferencia de crecimiento entre la cepa silvestre y la cepa con el gen restituido puede ser por la diferencia en la regulación

transcripcional del gen *CYS4* al estar en su locus natural o en el plásmido.

En las figuras 35, 36 y 37 se tienen los goteos de las seis cepas ya descritas en YPD con concentraciones 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 0.75 $\mu\text{g/mL}$ y 1 $\mu\text{g/mL}$ de tunicamicina en combinación con cisteína. En la concentración de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de tunicamicina la cepa *cys4* Δ + VV alcanza un crecimiento casi idéntico al de la cepa silvestre cuando se agrega 2 mM de cisteína al medio, aunque no igual. En contraste la cepa mutante S289D muestra sensibilidad a la tunicamicina, pero este fenotipo se revierte por completo al agregar cisteína al medio, creciendo incluso más que la cepa *cys4* Δ + *cys4*. Este fenotipo de recuperación del crecimiento se ve acentuado en las concentraciones más altas 0.75 $\mu\text{g/mL}$ y 1 $\mu\text{g/mL}$ de tunicamicina, ya que la mutante S289D crece cuando se agrega cisteína 2 mM incluso más que la cepa *cys4* Δ + *cys4* e igual que la cepa silvestre. También, el crecimiento de la mutante S289D es equiparable a la de las cepas con *Cys4p* constitutivamente activas.

En conclusión, el fenotipo de crecimiento con cisteína y tunicamicina en el medio podría ser ya que la mutante S289D tiene una mayor afinidad de sustrato por la cisteína en lugar de homocisteína. Probablemente por la interacción de las cargas de la serina fosforilada, en este caso emulado por el aminoácido fosfomimético ácido glutámico, con el cofactor PLP y con la cisteína propia. Sin embargo, parece ser que la proteína aún necesita activarse de cierta manera, ya que sin cisteína sigue teniendo un fenotipo de sensibilidad a la tunicamicina. Durante el estrés de retículo endoplásmico se producen especies reactivas de oxígeno localmente en el retículo endoplásmico por la formación de puentes disulfuro de las proteínas para alcanzar su conformación nativa. Se ha reportado que en células de tejido muscular liso la proteína CSE (homóloga a *Cys3p*) cambia su afinidad por sustratos cuando alguna de sus cisteínas sufre una S-sulfenilación por acción de especies reactivas de oxígeno (56). En levadura, la proteína *Cys3p* no tiene cisteínas para la regulación redox antes descrita, sin embargo *Cys4p* si la tiene. Por ende, es probable que la mutante S289D es más propensa a producir a H_2S a partir de cisteína, pero es necesario antes su total cambio de actividad catalítica por la oxidación de la cisteína 301.

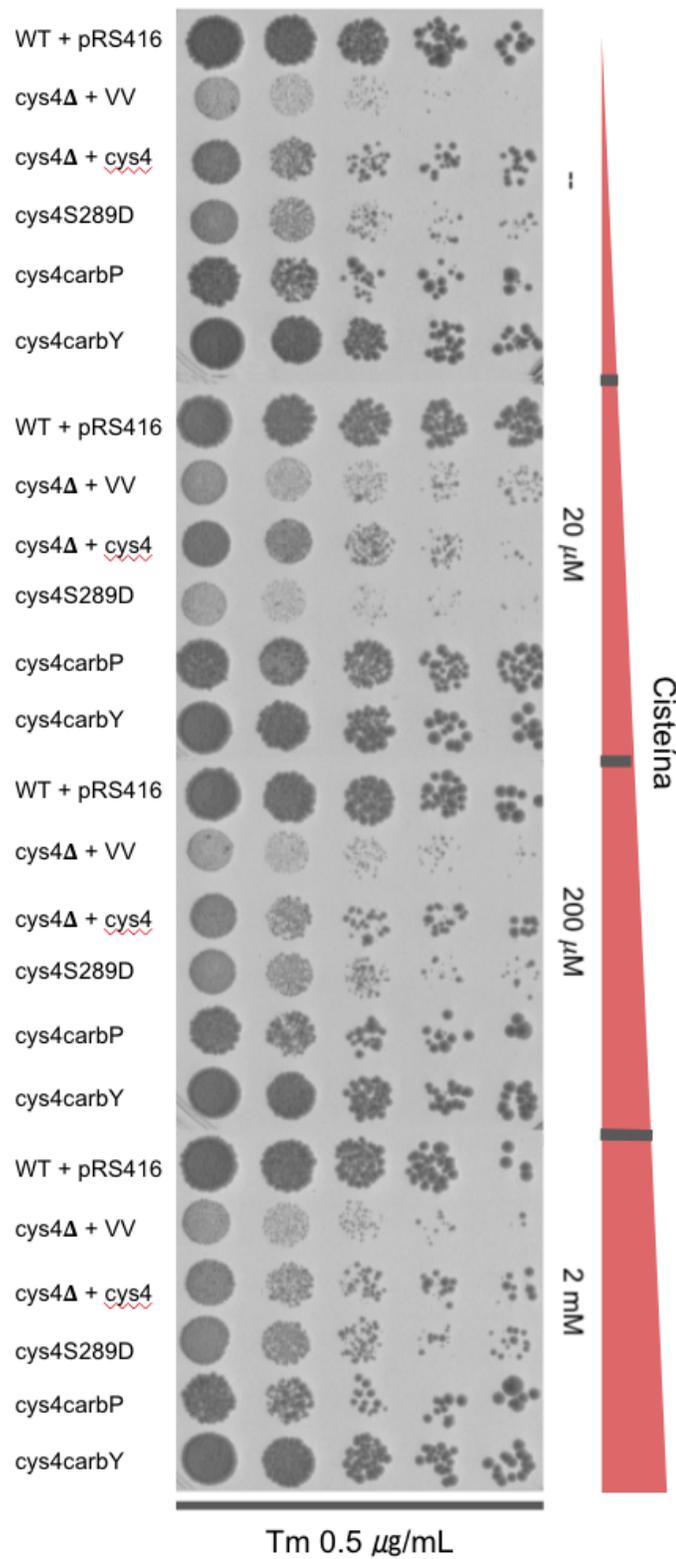


Figura 35. Recuperación del crecimiento en tunicamicina 0.5 µg/mL. Las cepas WT + pRS416, cys4Δ + VV, cys4Δ + cys4S, cys4S289D, cys4carbP y cys4carbY se cultivaron en medio con 0.5 µg/mL de tm y 20 µM, 200 µM o 2 mM de cisteína.

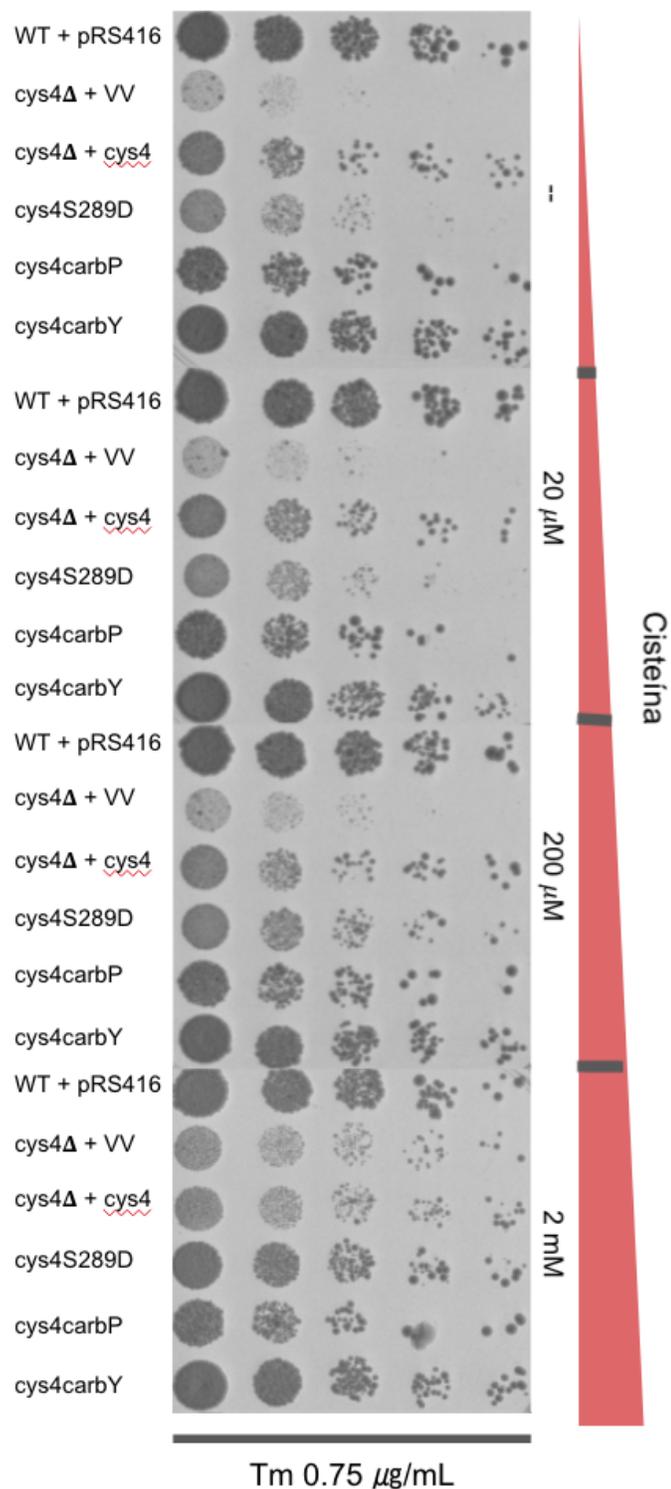


Figura 36. Recuperación del crecimiento en tunicamicina 0.75 µg/mL. Las cepas WT + pRS416, cys4Δ + VV, cys4Δ + cys4S, cys4S289D, cys4carbP y cys4carbY se cultivaron en medio con 0.75 µg/mL de tm y 20 µM, 200 µM o 2 mM de cisteína.

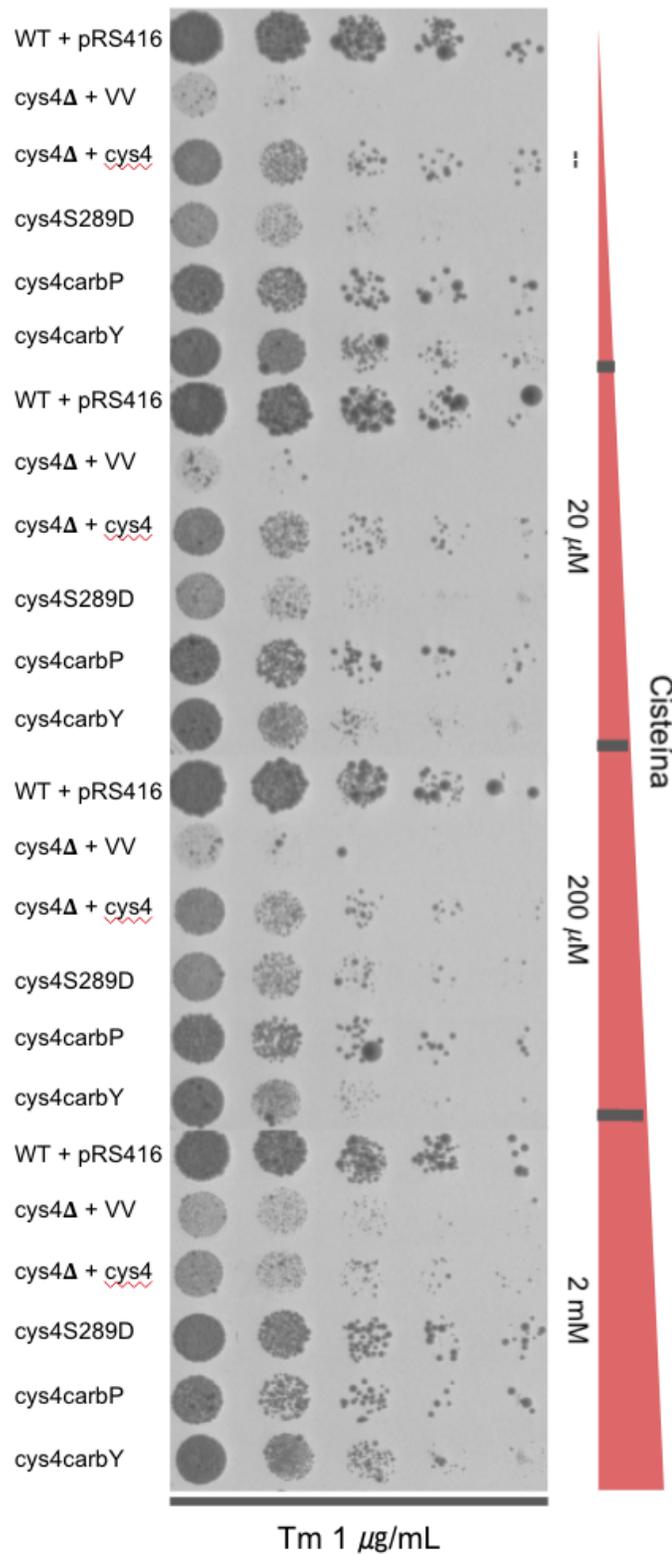


Figura 37. Recuperación del crecimiento en tunicamicina 1 µg/mL. Las cepas WT + pRS416, cys4Δ + VV, cys4Δ + cys4S, cys4S289D, cys4carbP y cys4carbY se cultivaron en medio con 1 µg/mL de tm y 20 µM, 200 µM o 2 mM de cisteína.

7.15 La cisteína 301 de Cys4p es importante para la respuesta a estrés de retículo endoplásmico

Para evaluar el papel del residuo de cisteína 301 de la proteína Cys4p en la regulación de la respuesta a proteínas mal plegadas producida por el estrés de retículo endoplásmico, se generaron las mutantes C301S y C301Y. La mutante C301S inhibe la regulación redox de la proteína ya que no existe un grupo tiol que pueda ser oxidado. En cambio la mutante C301Y emula a un grupo tiol S-sulfenilado, ya que las cargas del anillo aromático de la tirosina son muy parecidas a la de la modificación post-traducciona, sin embargo esta cisteína ya no puede formar puentes disulfuro con otras cisteínas.

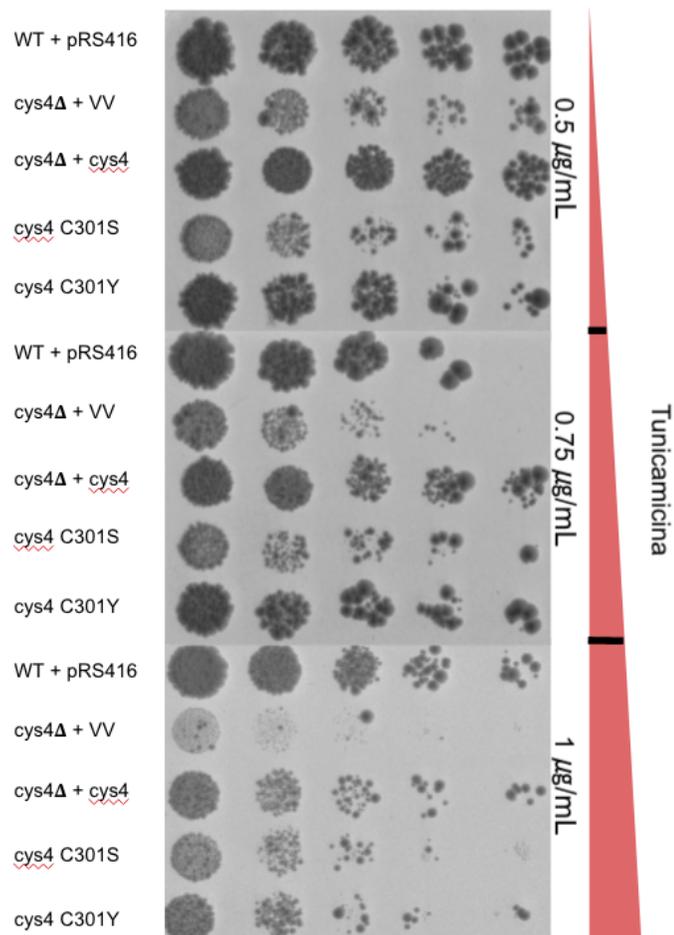
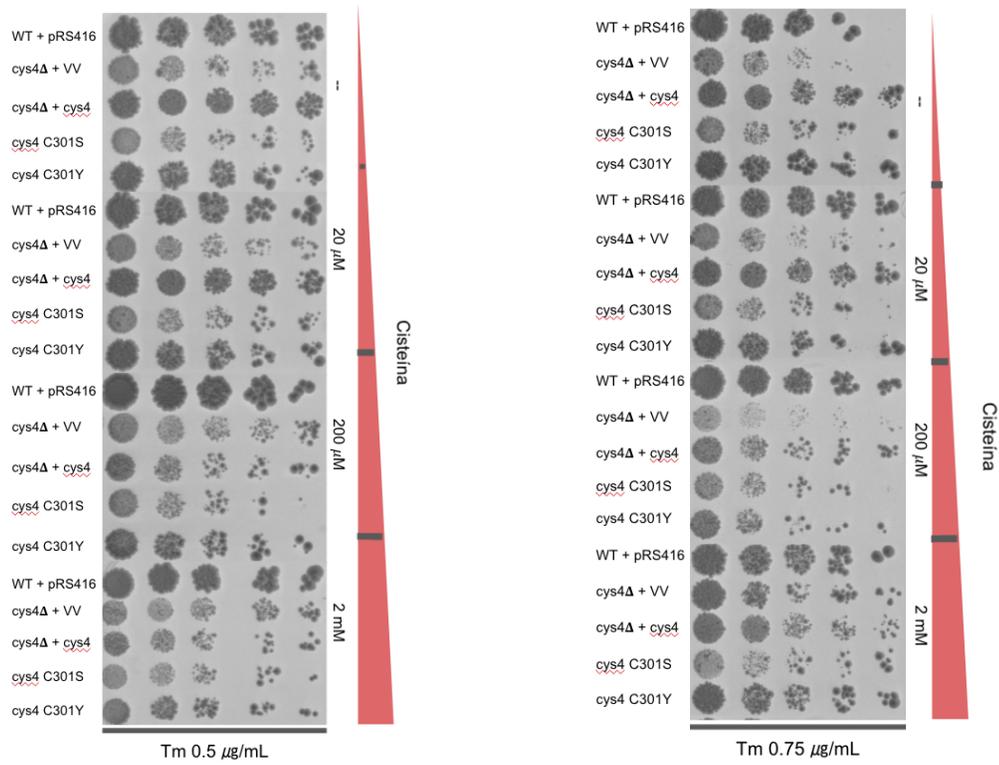


Figura 38. Efecto del estrés de retículo endoplásmico sobre las mutantes de la cisteína 301. Las cepas WT + pRS416, cys4Δ + VV, cys4Δ + cys4S, cys4C301S y cys4C301Y se cultivaron en medio con 0.5 µg/mL, 0.75 µg/mL y 1 µg/mL de tm.

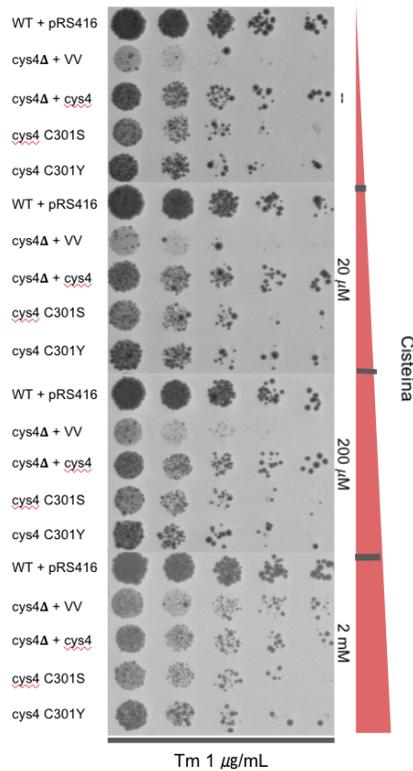
En la figura 38 se observan los goteos de las cepas *WT* + pRS416, *cys4Δ* + VV, *cys4Δ* + *cys4*, *cys4C301S* y *cys4C301Y* en las concentraciones de tunicamicina 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 0.75 $\mu\text{g/mL}$ y 1 $\mu\text{g/mL}$. Desde la concentración más baja se alcanza a ver una leve sensibilidad en la mutante C301, pero en la concentración más alta se vuelve evidente al crecer menos que la cepa *cys4Δ* + *cys4* y que la silvestre. En cambio la cepa C301Y mantiene un crecimiento parecido al de la cepa *cys4Δ* + *cys4* independientemente de las concentraciones de tunicamicina. Podría ser que la sensibilidad de la cepa C301S no es tan marcada ya que normalmente Cys4p si puede producir H_2S a partir de cisteína, pero es necesaria la oxidación de la cisteína C301 para que ocurra la preferencia de sustrato hacia cisteína. El hecho de que la mutante C301Y mantenga el crecimiento de la cepa *cys4Δ* + *cys4* corrobora la aseveración anterior, ya que esta cuenta con las cargas parecidas a una cisteína S-sulfenilada.

Para corroborar la posible selectividad de sustrato a través de la regulación de la cisteína 301, en la figura 39 se ven los goteos de las cepas ya mencionadas en medio YPD con las combinaciones de las concentraciones de tunicamicina y cisteína. En las dos concentraciones más bajas se observa una reducción muy tenue del crecimiento de la cepa C301S e incluso la adición de cisteína en el medio no logra curar el fenotipo de sensibilidad del todo. Sin embargo en la concentración más alta de 1 $\mu\text{g/mL}$ de tunicamicina se vuelve evidente que, incluso con cisteína 2 mM, la cepa C301S no crece al mismo nivel que la cepa *cys4Δ* + *cys4*. La cepa C301Y también muestra cierta sensibilidad a la concentración más alta de tunicamicina, incluso agregando cisteína al medio. Estos resultados hacen pensar que la cisteína 301 de la proteína Cys4p es esencial para la adaptación a estrés de retículo endoplásmico, aunado con el papel de la serina 289. En conclusión parece que la selectividad del sustrato por la proteína Cys4p depende de la regulación redox de su cisteína 301 y la posterior regulación de su serina 289.



(a)

(b)



(c)

Figura 39. Recuperación del crecimiento bajo estrés de retículo endoplásmico. Las cepas WT + pRS416, cys4Δ + VV, cys4Δ + cys4S, cys4C301S y cys4C301Y se cultivaron en medio con a) 0.5 µg/mL, b) 0.75 µg/mL y c) 1 µg/mL de tm y con 20 µM, 200 µM y 2 mM de cisteína.

7.16 La cisteína 301 de Cys4p es importante para la respuesta a estrés oxidativo

Para corroborar la regulación redox de la cisteína 301 de Cys4p y su papel en la posible producción de H₂S a partir del cambio en la afinidad de sustrato por cisteína, se realizaron goteos de las cepas mencionadas en el apartado anterior en medio YPD con H₂O₂. En la figura 40 se tienen las cepas en las concentraciones 3 mM, 5 mM y 7 mM de H₂O₂. En la concentración más alta únicamente la cepa silvestre crece por la intensidad de la estimulación de estrés oxidativo, sin embargo en las concentraciones de 3 y 5 mM se observa que la mutante C301S tiene una marcada sensibilidad al estrés oxidativo ya que crece igual que la cepa *cys4*Δ y tiene un menor crecimiento que la cepa *cys4*Δ + *cys4*. La cepa C301Y tiene un fenotipo de crecimiento más apto que la cepa *cys4*Δ + *cys4*.

Este resultado nos podría indicar que en el caso de la cepa C301S no existe este cambio regulatorio inducido por especies reactivas de oxígeno y esto provoca que en estas condiciones su crecimiento sea igual a la mutante de su gen. Por el contrario, en el caso de la cepa C301Y no existe un detrimento en su crecimiento ya que la cisteína se encuentra permanentemente con propiedades parecidas a la de la proteína original en estado oxidado. Con esto se concluye que el fenómeno regulatorio dependiente de la cisteína 301 que existe durante el estrés de retículo endoplásmico, se comparte con el estrés oxidativo.

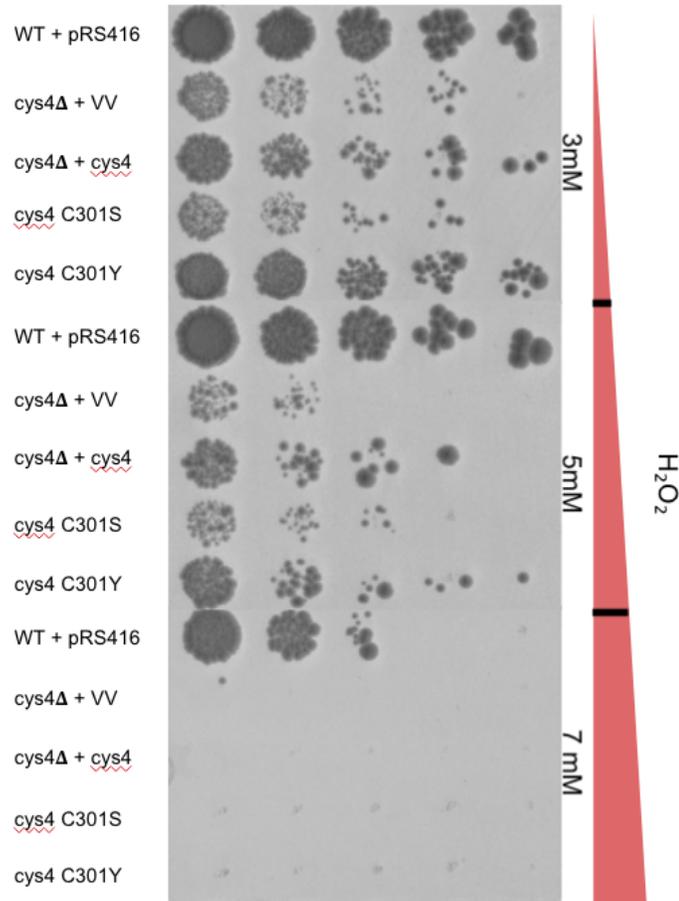
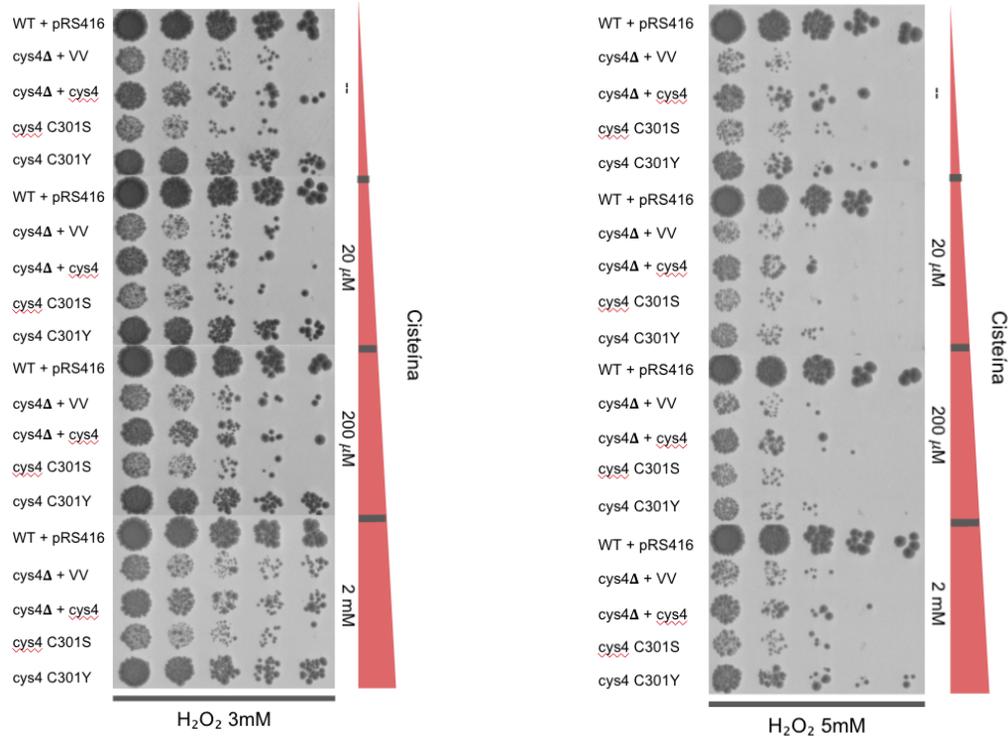


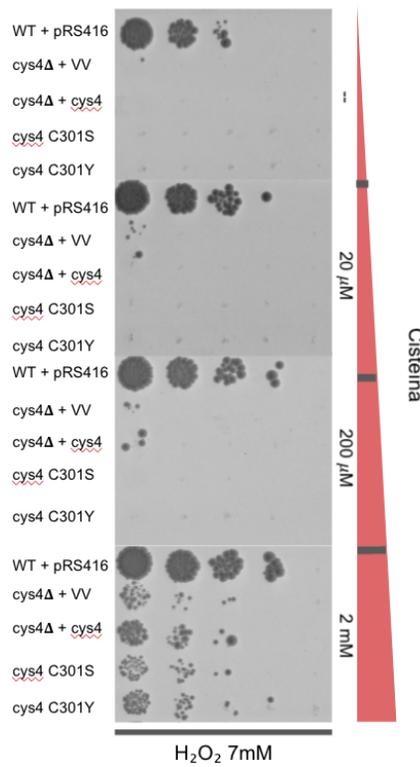
Figura 40. Efecto del estrés oxidativo sobre las mutantes de la cisteína 301. Las cepas WT + pRS416, *cys4*Δ + VV, *cys4*Δ + *cys4*, *cys4*C301S y *cys4*C301Y se cultivaron en medio con 3 mM, 5 mM y 7 mM de H₂O₂.

Para comprobar que esta posible selectividad de sustrato también se repite en estrés oxidativo, en la figura 41 se tienen goteos en medio YPD con la combinación de concentraciones de H₂O₂ y cisteína. Interesantemente, la cepa mutante C301S nunca recupera el crecimiento como la cepa silvestre o la cepa *cys4*Δ + *cys4*, incluso en la concentración más baja de H₂O₂ y 2 mM de cisteína. Este fenotipo de sensibilidad incluso con cisteína se ve más acentuado en las concentraciones de 3 y 5 mM de cisteína. La cepa C301Y siempre mantiene un fenotipo de crecimiento parecido al de la cepa silvestre e incluso de mayor crecimiento con respecto a la cepa *cys4*Δ + *cys4*. De esta manera se comprueba que la regulación de la actividad de Cys4p a través de su residuo de cisteína 301 es en condiciones de oxidación y esto ayuda a sobrevivir al estrés oxidativo.



(a)

(b)



(c)

Figura 41. Recuperación del crecimiento bajo estrés oxidativo. Las cepas WT + pRS416, cys4Δ + VV, cys4Δ + cys4S, cys4C301S y cys4C301Y se cultivaron en medio con a) 3 mM b) 5 μM y c) 7 μM de H₂O₂ y con 20 μM, 200 μM o 2 mM de cisteína.

8 Discusión

La proteína Cys4p canónicamente es la primera proteína de la vía de la trans-sulfuración encargada de producir cisteína a partir de homocisteína, estando esto conservado en la mayoría de los organismos eucariotas. Esta actividad clásica consta de transformar una molécula de homocisteína y L-serina a cistationina con ayuda del cofactor piridoxal 5-fosfato (PLP). Además de la actividad canónica, la proteína Cys4p también puede llevar a cabo una serie de reacciones alternas en las cuales producirá, entre otros metabolitos, al ácido sulfhídrico (H₂S) (35). Resulta interesante corroborar que los sustratos para estas actividades alternas son el producto original de la propia Cys4p y el producto de la ruta metabólica, en esencia cistationina y cisteína, lo que podría implicar un mecanismo de regulación dentro de la misma ruta metabólica. Por lo tanto, resulta intrigante que la mutante del gen *CYS4* muestre un fenotipo de sensibilidad cuando se cultiva con el antibiótico tunicamicina que inhibe la glicosilación de proteínas y produce estrés de retículo endoplásmico. Esto podría ocurrir por la ausencia de cisteína, ya que se interrumpe la ruta de producción de este aminoácido esencial azufrado, vital para distintos procesos fisiológicos celulares y para la producción de glutatión, sin embargo, este fenotipo no ocurre con la misma intensidad en la mutante del gen *CYS3*. Lo anterior implica que la sensibilidad no ocurre por la interrupción en la vía de la trans-sulfuración y podría ser por alguna particularidad de la proteína Cys4p.

Otro factor que podría explicar la sensibilidad especial de la mutante *cys4*Δ es la acumulación de homocisteína, ya que al estar ausente Cys4p no puede ser transformada la homocisteína en cisteína. Estudios anteriores a este han reportado que la acumulación de homocisteína induce estrés proteotóxico en las células (54), sin embargo, aquí se ha reportado que agregando hasta 2 mM de homocisteína al medio no altera el crecimiento de las células.

Aunque la interrupción de la vía de la transulfuración no es la causa de la aguda sensibilidad de la mutante *cys4*Δ a tunicamicina, la baja en la producción de la cisteína podría ser un factor importante en este fenotipo. Al agregar cisteína al medio en combinación con tunicamicina

se recupera el crecimiento perdido durante el estrés de retículo endoplásmico, con un mayor aumento en la cepa *cys4Δ*. Esto podría deberse a que a partir de la cisteína se produce el glutatión de la célula, esencial para la reducción de las especies reactivas de oxígeno producidas durante el plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico, sin embargo, estudios previos en el laboratorio han demostrado que al agregar glutatión en combinación con tunicamicina no se recupera el crecimiento de las células(55). Todo lo anterior hace pensar que podría ser otro el efecto por el que la cisteína recupera el crecimiento de las células. Como se mencionó anteriormente, la cisteína es uno de los sustratos alternativos con los que las proteínas Cys4p y Cys3p producen H₂S, lo cual podría ser necesario para que la célula se adapte correctamente al estrés de retículo endoplásmico. Esto se refuerza ya que, como se describe en la introducción, en seres humanos existen enfermedades asociadas tanto a la desregulación de la respuesta a estrés de retículo endoplásmico como a la desregulación del metabolismo del H₂S.

Durante el estrés oxidativo se produce H₂S como un mecanismo de respuesta inmediato para prevenir la oxidación irreversible de las proteínas celulares y la activación o inactivación de vías de señalización (46,56). Al cultivar las cepas mutantes de los genes *CYS3* y *CYS4* en medio adicionado con H₂O₂ mostraron una aguda restricción de crecimiento. Al ser estas dos proteínas una de las principales productoras de H₂S, es necesario que estén funcionando correctamente para la adaptación a este tipo de estrés. En este caso ambas proteínas muestran un fenotipo de sensibilidad de igual intensidad, a diferencia de la inducción con tunicamicina. Esto nos podría indicar que para responder al estrés oxidativo ambas proteínas son suficientes para cubrir la demanda necesaria de H₂S en la célula, mientras que en la respuesta al estrés de retículo endoplásmico la proteína Cys4p juega un papel fundamental.

De igual manera al caso del estrés de retículo endoplásmico, la cisteína evita la restricción de crecimiento inducido por el estrés oxidativo. En el desarrollo de estos dos trastornos fisiológicos, estrés oxidativo y estrés de retículo endoplásmico, se producen intrínsecamente especies reactivas de oxígeno por lo que es necesario la producción de H₂S, sin embargo, parece ser que en el ER la producción es a partir de Cys4p. Como se mencionó anteriormente, la cisteína es un sustrato alternativo de Cys3p y Cys4p, sin embargo, normalmente estas

proteínas tienen una alta afinidad a sus sustratos canónicos. En el caso de Cys4p tiene una mayor afinidad por su sustrato canónico L-serina, aunado a que normalmente se encuentra en concentraciones mucho más elevadas que la cisteína, vuelve una interrogante en que momento produce H₂S a partir de cisteína. Estudios previos a este han demostrado que una posible selección en la afinidad del sustrato se da a partir de la oxidación en cisteínas de la proteína (56). Interesantemente Cys3p, al contrario que su homólogo en humanos, no cuenta con cisteínas dentro de su estructura. En cambio, Cys4p cuenta con un residuo de cisteína en la posición 301. En el caso de que existiera la selectividad de sustrato, la recuperación en la cepa *cys4*Δ se explica ya que al agregar una alta concentración de cisteína, lo que competiría con mejor rendimiento para producir H₂S a partir de Cys3p.

Ire1p reconoce proteínas mal plegadas que se acumulan durante el estrés de retículo endoplásmico, y activa la traducción del factor de transcripción Hac1p. Hac1p juega un papel fundamental en la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) ya que es la última proteína en la cascada de señalización y activa la transcripción de los genes necesarios para la adaptación al estrés y así evitar la muerte celular (12). Por lo tanto, es esperado que la mutante *hac1*Δ sea sensible incluso a concentraciones tan bajas de tunicamicina. Sorprendentemente, la cepa mutante de *CYS4* es más sensible a concentraciones de 0.04 μg/mL de tunicamicina que la cepa mutante del gen *HAC1*, fenómeno que ocurre contrariamente a concentraciones altas donde *hac1*Δ se inhibe casi por completo su crecimiento y la cepa *cys4*Δ muestra un fenotipo de crecimiento más apto. Al agregar cisteína al medio, interesantemente las cepas de la mutante sencilla *HAC1* y la doble mutante de *HAC1/CYS4* nunca recuperan su crecimiento, a menos que sea con concentraciones tan bajas como 0.04 μg/mL de tunicamicina. Todo lo anterior parece indicar una probable interacción genética entre *CYS4* y *HAC1*. Aunado a ello, parece que el papel de Cys4p en la adaptación al estrés de retículo endoplásmico podría ocurrir en etapas tempranas del estrés de retículo. Por otro lado, el hecho de que la doble mutante nunca tenga un crecimiento más allá de la mutante sencilla *hac1*Δ hace pensar que el papel de Cys4p ocurre río arriba de la activación del factor de transcripción.

La evaluación de una posible interacción genética entre los genes *CYS4* y *HAC1* se

realizó a través de la cinética de crecimiento de las mutantes sencillas y de la doble mutante. En la figura 23 se observa que la curva correspondiente a *hac1*Δ (color verde) termina su crecimiento de fase lag aproximadamente 6 horas antes que la curva de la cepa silvestre (color azul), por lo que se puede decir que tiene un fenotipo de crecimiento más apto con respecto a la cepa silvestre. En contraste la curva de la cepa *cys4*Δ (color rojo) tiene un crecimiento marcadamente más lento que la cepa silvestre, ya que termina el crecimiento de su fase lag aproximadamente 10 horas después de la cepa silvestre. En el caso de que no existiera una interacción genética entre estos dos genes se esperaría que el fenotipo de crecimiento de la doble mutante fuera la suma de los fenotipos de las mutantes sencillas, por lo que debería de tener un crecimiento mayor al de la cepa *cys4*Δ. Sin embargo, la curva correspondiente a la cepa *cys4*Δ*hac1*Δ tiene un fenotipo de crecimiento menos apto del esperado, ya que alcanza el final de su fase lag aproximadamente un par de horas después de la mutante del gen *CYS4*. Este fenómeno se repite cuando se agregó tunicamicina al medio, además que la cepa *cys4*Δ tiene una sensibilidad mayor que la cepa *hac1*Δ a esas concentraciones. Con esto podemos concluir que existe una interacción genética negativa entre los genes *CYS4* y *HAC1*, lo cual en conjunto con lo encontrado en los goteos, fortalece la hipótesis de que Cys4p tiene un papel en la adaptación al estrés de retículo endoplásmico a través de su producción de H₂S por la degradación de cisteína. Esta es la primera ocasión que se reporta una interacción entre los genes *CYS4* y *HAC1*, lo cual es algo inesperado ya que la proteína Cys4p no se ha encontrado que tenga localización en el retículo endoplásmico o que se active especialmente durante el desarrollo de estrés de retículo endoplásmico. Durante el plegamiento de proteínas se producen especies reactivas de oxígeno (13) por lo que podría ser que la producción de H₂S es importante para el funcionamiento normal del retículo, pero se vuelve esencial durante el estrés de retículo endoplásmico ya que al incrementarse la demanda de plegamiento, podrían incrementarse las especies reactivas de oxígeno. Es necesario profundizar en el estudio de la localización de Cys4p y su interactoma durante el estrés de retículo endoplásmico para conocer con exactitud el papel de esta proteína durante la respuesta a proteínas mal plegadas.

En la presente investigación se ha encontrado una interacción genética entre los genes *HAC1* y *CYS4* lo que explica el papel de Cys4p en la adaptación al estrés de retículo endoplásmico.

Esto podría ocurrir al producir H₂S a partir de la degradación de cisteína, ya que al agregar el aminoácido al medio se recupera el crecimiento perdido al inducir estrés de retículo endoplásmico. Aunque tanto Cys3p y Cys4p pueden producir H₂S a partir de cisteína, la mutante del gen de la segunda muestra una acentuada sensibilidad al agregar tunicamicina al medio, por lo que parece ser que Cys4p tiene un papel esencial. Aunque las mutantes de ambos genes recuperan los fenotipos de sensibilidad al estrés de retículo endoplásmico y al estrés oxidativo cuando se agrega cisteína al medio, esto se podría explicar por las concentraciones de cisteína tan altas y que no encontramos naturalmente en las células. Recientemente se ha descrito la importancia de las cisteínas y las serinas de esta familia de proteínas para el cambio en la preferencia de su sustrato canónico a los alterno (56). De estas dos proteínas, únicamente Cys4p tiene una cisteína dentro de su estructura proteica. En el alineamiento de la secuencia de Cys4p de levadura y CSB de humanos encontramos que la cisteína 301 (C301) de Cys4p no está conservada en humanos, sin embargo, la serina 289 y los residuos aledaños sí. Estudios anteriores a este han reportado que la mutación de la serina 289 (S289) por un ácido glutámico (D) inhibe la actividad canónica de Cys4p (52). La S289 se encuentra conservado en humanos en la serina 349, la cual ha sido reportada en bases de mutaciones que inhibe la formación de homotetrámero y la actividad canónica de CSB. La pérdida en la regulación de esta serina se ha relacionado con la acumulación de homocisteína en sangre (homocisteinuria) de pacientes humanos (35), por lo que el estudio de su función ayudaría a entender el desarrollo de esta patofisiología.

En la estructura 6C2Z de Cys4p se observa que la C301 y la S289 se encuentran en la misma estructura secundaria, lo que hace posible una regulación entre ambos residuos. La S289 se encuentra en el sitio catalítico de Cys4p, a una distancia de 3 Å del cofactor piridoxal 5-fosfato (PLP) lo que vuelve a este residuo esencial para la actividad catalítica de esta proteína. Resulta interesante que al mutar la serina por un ácido glutámico se inhiba esta actividad, ya que este aminoácido se ha reportado que actúa como fosfomimético por lo que resulta como si la serina se encontrara fosforilada. Se ha reportado que en la proteína CSE (Cys3p) de humanos, cambios en la interacción de las cargas de serinas con PLP afectan la selectividad de sustrato de la proteína hacia cisteína (56). En el alineamiento de los cristales de

la proteína Cys4p y CSB se observa una gran conservación de la estructura terciaria, por lo que lo aquí encontrado podría ser relevante para los procesos fisiológicos en humanos. Con el análisis de la estructura tridimensional de la proteína y de la secuencia peptídica, se da pie a la posibilidad de un mecanismo redox de la C301 de Cys4p a través de la S289 para la selección de sustrato de esta enzima.

La serina 289 es esencial para la adaptación a estrés de retículo endoplásmico. Cuando se somete la mutante cys4S289D a tunicamicina tiene un fenotipo de sensibilidad a tunicamicina con respecto a la cepa silvestre, pero no al mismo nivel que la mutante completa. Sin embargo, cuando se agregó cisteína al medio hubo una recuperación total del crecimiento, incluso mayor que la cepa control donde se le restituyó el gen silvestre. Esto resulta particularmente interesante ya que por un lado parece que esta mutación por sí sola vuelve más sensible a la célula al estrés de retículo endoplásmico. Esto podría ocurrir probablemente porque el tener interrumpida la vía de transulfuración, y por ende cantidades anormales de cisteína y sus derivados, vuelve en primera instancia menos apta a la célula para adaptarse a este estrés. Sin embargo, al agregar cisteína vemos un crecimiento acentuado en presencia de esta mutante, probablemente porque si se tiene mayor preferencia de sustrato por cisteína desde un inicio puede aprovechar con mayor rendimiento al aminoácido y, probablemente, producir una mayor cantidad de H₂S. Una posibilidad del crecimiento disminuido por la adición de cisteína es que el cambio en el sustrato no es un fenómeno aislado al cambio en la cisteína, si no que hay otros factores, probablemente la oxidación de la C301.

Al igual que la S289, la cisteína 301 de Cys4p es esencial para la adaptación a estrés de retículo endoplásmico. La mutación de una cisteína por una serina inactiva su capacidad de sufrir regulaciones redox sin alterar la estructura tridimensional de la proteína, ya que el aminoácido serina es exactamente igual que una cisteína sin su grupo tiol. Por otro lado, se ha reportado que al cambiar este residuo por una tirosina se emula la oxidación de la cisteína por las cargas electrostáticas de su anillo aromático. Al inactivar la regulación redox de Cys4p a través de la mutante C301S se elimina la capacidad de la proteína a responder al estrés de retículo endoplásmico, ya que al cultivar esta cepa en distintas concentraciones de

tunicamicina se aprecia un deterioro en el crecimiento con respecto a la cepa silvestre, aunque tiene un fenotipo de crecimiento mas apto que la cepa *cys4Δ*. Esta hipótesis se refuerza al agregar cisteína al medio y continuar con la misma sensibilidad al antibiótico. Lo anterior hace pensar que esta proteína es deficiente en su capacidad de utilizar como sustrato a la cisteína para producir H₂S, vital para la adaptación al estrés de retículo endoplásmico. Esto se aprecia mejor cuando la mutante C301Y mantiene un fenotipo de crecimiento idéntico a la cepa silvestre e incluso, en algunas ocasiones, mayor al de la cepa con el gen restituido. Con todo esto se concluye un posible papel de la C301 en la selectividad de sustrato de Cys4p a través de su regulación redox, continuado por la probable diferencia en la interacción de la cisteína 289 en el sitio catalítico.

Por último, para corroborar que se trata de una regulación redox de la cisteína 301, se cultivaron las cepas en medio con la especie reactiva de hidrógeno H₂O₂. Ocurre un fenómeno parecido al que se vió con las cepas sujetas a estrés de retículo endoplásmico. Con esto corroboramos que los fenotipos observado ocurren en condiciones de estrés oxidativo, donde es posible que se oxide la C301. Anteriormente se ha reportado que la S-persulfuración de proteínas funciona como método de protección contra la oxidación irreversible (31), por lo que la producción de H₂S debería de responder a la concentraciones de especies reactivas de oxígeno. Efectivamente, se ha reportado que durante el estrés oxidativo hay un incremento en las concentraciones celulares de H₂S, sin embargo, como se regula su producción aún es inconcluso. En células de músculo liso de humanos se ha reportado que la oxidación cisteínas de la proteína CSE (Cys3p) podría cambiar la afinidad de sustrato hacia cisteína (56). En el caso anterior la cisteína podría actuar como sensor redox para producir ácido sulfhídrico en condiciones de estrés oxidativo. Dado que la cisteína 301 de Cys4p parece tener un papel en la adaptación a estrés de retículo endoplásmico y estrés oxidativo, podría ser la productora primaria de H₂S en levadura. Su estudio a profundidad para entender su regulación toma importancia, ya que como se describió en la sección de introducción, problemas en el metabolismo del H₂S está relacionado con 7 de las 10 causas de mayor mortalidad en México (57).

En la presente investigación se sientan las bases para un estudio mas profundo del papel de la producción de H₂S a través de Cys4p en la adaptación a estrés de retículo endoplásmico. Se describió la interacción genética negativa entre los genes *HAC1* y *CYS4*. Por primera vez se observaron los efectos de las mutaciones en la C301 y S289 y se demostró que su presencia es esencial para el crecimiento de las células en estrés de retículo endoplásmico y estrés oxidativo. Aún queda por investigar si efectivamente la C301 esta sufriendo modificaciones post-traduccionales en este tipo de procesos fisiológicos. También queda abierta la pregunta de que es lo que pasa con la estructura cuaternaria de Cys4p, ya que se ha reportado que esto podría tener incidencia en su actividad catalítica.

9 Bibliografía

1. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, et al. Life with 6000 genes. *Science*. 1996;274(5287):546-567.
2. Sherman F. Getting started with yeast. *Methods Enzymol*. 2002;350:3-41.
3. Botstein D, Chervitz SA, Cherry JM. Yeast as a model organism. *Science*. 1997;277(5330):1259-1260.
4. Heinicke S, Livstone MS, Lu C, et al. The Princeton Protein Orthology Database (P-POD): a comparative genomics analysis tool for biologists. *PLoS One*. 2007;2(8):e766.
5. Fagone P, Jackowski S. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J Lipid Res*. 2009;50
6. Hebert DN, Garman SC, Molinari M. The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. *Trends Cell Biol*. 2005;15(7):364-370.
7. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell*. 2007;131(6):1047-1058.
8. English AR, Voeltz GK. Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(4):a013227.
9. Jan CH, Williams CC, Weissman JS. Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science*. 2014;346(6210):1257521.
10. Braakman I, Hebert DN. Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(5):a013201.
11. Kaneko M, Imaizumi K, Saito A, et al. ER Stress and Disease: Toward Prevention and Treatment. *Biol Pharm Bull*. 2017;40(9):1337-1343.

12. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011;334(6059):1081-1086.
13. Ochoa CD, Wu RF, Terada LS. ROS signaling and ER stress in cardiovascular disease. *Mol Aspects Med*. 2018;63:18-29.
14. Lebeau-pin C, Vallée D, Hazari Y, Hetz C, Chevet E, Bailly-Maitre B. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2018;69(4):927-947.
15. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. ER stress activates immunosuppressive network: implications for aging and Alzheimer's disease. *J Mol Med (Berl)*. 2020;98(5):633-650.
16. Karagöz GE, Acosta-Alvear D, Walter P. The Unfolded Protein Response: Detecting and Responding to Fluctuations in the Protein-Folding Capacity of the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2019;11(9):a033886.
17. Hendershot LM. The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med*. 2004;71(5):289-297.
18. Wang J, Sevier CS. Formation and Reversibility of BiP Protein Cysteine Oxidation Facilitate Cell Survival during and post Oxidative Stress. *J Biol Chem*. 2016;291(14):7541-7557.
19. Dong M, Bridges JP, Apsley K, Xu Y, Weaver TE. ERdj4 and ERdj5 are required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation of misfolded surfactant protein C. *Mol Biol Cell*. 2008;19(6):2620-2630.
20. Belyy V, Tran NH, Walter P. Quantitative microscopy reveals dynamics and fate of clustered IRE1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(3):1533-1542.
21. Hourihan JM, Moronetti Mazzeo LE, Fernández-Cárdenas LP, Blackwell TK. Cysteine Sulfenylation Directs IRE-1 to Activate the SKN-1/Nrf2 Antioxidant Response. *Mol Cell*. 2016;63(4):553-566.

22. Xia X. Translation Control of *HAC1* by Regulation of Splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Mol Sci*. 2019;20(12):2860.
23. Pal B, Chan NC, Helfenbaum L, Tan K, Tansey WP, Gething MJ. SCFCdc4-mediated degradation of the Hac1p transcription factor regulates the unfolded protein response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 2007;18(2):426-440.
24. Cox JS, Walter P. A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*. 1996;87(3):391-404
25. Parker ET, Cleaves HJ, Dworkin JP, et al. Primordial synthesis of amines and amino acids in a 1958 Miller H₂S-rich spark discharge experiment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(14):5526-5531.
26. Nicholls P, Marshall DC, Cooper CE, Wilson MT. Sulfide inhibition of and metabolism by cytochrome c oxidase. *Biochem Soc Trans*. 2013;41(5):1312-1316.
27. Yang G, Wu L, Jiang B, et al. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*. 2008;322(5901):587-590.
28. Mancuso C, Navarra P, Preziosi P. Roles of nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neurochem*. 2010;113(3):563-575.
29. Pan TT, Feng ZN, Lee SW, Moore PK, Bian JS. Endogenous hydrogen sulfide contributes to the cardioprotection by metabolic inhibition preconditioning in the rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;40(1):119-130.
30. Krejcova T, Smelcova M, Petr J, et al. Hydrogen sulfide donor protects porcine oocytes against aging and improves the developmental potential of aged porcine oocytes. *PLoS One*. 2015;10(1):e0116964.
31. Zivanovic J, Kouroussis E, Kohl JB, et al. Selective Persulfide Detection Reveals Evolutionarily Conserved Antiaging Effects of S-Sulfhydryl. *Cell Metab*. 2019;30(6):1152-1170.e13.

32. Chen HJ, Ngowi EE, Qian L, et al. Role of Hydrogen Sulfide in the Endocrine System. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:704620.
33. Petrovic D, Kouroussis E, Vignane T, Filipovic MR. The Role of Protein Persulfidation in Brain Aging and Neurodegeneration. *Front Aging Neurosci*. 2021;13:674135. Published 2021 Jun 23.
34. Hellmich MR, Szabo C. Hydrogen Sulfide and Cancer. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;230:233-241.
35. Singh S, Padovani D, Leslie RA, Chiku T, Banerjee R. Relative contributions of cystathionine beta-synthase and gamma-cystathionase to H₂S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions. *J Biol Chem*. 2009;284(33):22457-22466.
36. Niu WN, Yadav PK, Adamec J, Banerjee R. S-glutathionylation enhances human cystathionine β -synthase activity under oxidative stress conditions. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22(5):350-361.
37. d'Emmanuele di Villa Bianca R, Mitidieri E, Esposito D, et al. Human Cystathionine- β -Synthase Phosphorylation on Serine227 Modulates Hydrogen Sulfide Production in Human Urothelium. *PLoS One*. 2015;10(9):e0136859.
38. Kabil O, Zhou Y, Banerjee R. Human cystathionine beta-synthase is a target for sumoylation. *Biochemistry*. 2006;45(45):13528-13536.
39. Venne AS, Kollipara L, Zahedi RP. The next level of complexity: crosstalk of posttranslational modifications. *Proteomics*. 2014;14(4-5):513-524.
40. Kumsta C, Thamsen M, Jakob U. Effects of oxidative stress on behavior, physiology, and the redox thiol proteome of *Caenorhabditis elegans*. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(6):1023-1037.
41. Li S, Yu K, Wu G, et al. pCysMod: Prediction of Multiple Cysteine Modifications Based on Deep Learning Framework. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:617366.

42. Mishanina TV, Libiad M, Banerjee R. Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. *Nat Chem Biol.* 2015;11(7):457-464.
43. Mustafa AK, Sikka G, Gazi SK, et al. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ Res.* 2011;109(11):1259-1268.
44. Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, et al. H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Sci Signal.* 2009;2(96):ra72. Published 2009 Nov 10.
45. Giovinazzo D, Bursac B, Sbodio JI, et al. Hydrogen sulfide is neuroprotective in Alzheimer's disease by sulfhydrating GSK3 β and inhibiting Tau hyperphosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(4):e2017225118
46. Dóka É, Ida T, Dagnell M, et al. Control of protein function through oxidation and reduction of persulfidated states. *Sci Adv.* 2020;6(1):eaax8358.
47. Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, et al. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast.* 1998;14(2):115-132.
48. Martinez-Velázquez R.P. Interacción genética entre los genes *CYS4* y *CLN3* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. [Tesis de pregrado] Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2020.
49. Thermo Scientific. Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit. [Internet] 2019. Consultado en: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013377_Phusion_SiteDirectedMutagenesisUG.pdf
50. Güldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(13):2519-2524.
51. Quazi F, Aitken SM. Characterization of the S289A,D mutants of yeast cystathionine beta-synthase. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1794(6):892-897.

52. Dissmeyer N, Schnittger A. Use of phospho-site substitutions to analyze the biological relevance of phosphorylation events in regulatory networks. *Methods Mol Biol.* 2011;779:93-138.
53. Urreizti R, Asteggiano C, Cozar M, et al. Functional assays testing pathogenicity of 14 cystathionine-beta synthase mutations. *Hum Mutat.* 2006;27(2):211.
54. Liu HH, Shih TS, Huang HR, Huang SC, Lee LH, Huang YC. Plasma homocysteine is associated with increased oxidative stress and antioxidant enzyme activity in welders. *ScientificWorldJournal.* 2013;2013:370487.
55. Jiménez-Tufiño H. L. Participación de Cys4p en respuesta a estrés de retículo endoplásmico de *Saccharomyces cerevisiae*. [Tesis de pregrado] Ciudad de México: Universidad Veracruzana; 2018.
56. Wang J, Jia G, Li H, et al. H₂O₂-Mediated Oxidative Stress Enhances Cystathionine-Lyase-Derived H₂S Synthesis via a Sulfenic Acid Intermediate. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(9):1488.
57. Comunicación social Inegi. Características de las defunciones registradas en México durante 2019. INEGI. 2019.