



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Dinámica de la Persulfuración y la Sulfenilación de Residuos de Cisteína en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, durante el crecimiento y la respuesta al H₂O₂

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Jorge Damián Ramírez Robles

TUTOR PRINCIPAL
Dr. José Francisco Torres Quiroz
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Salvador Uribe Carvajal
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Luis Cárdenas Torres
Instituto de Biotecnología, UNAM

Ciudad de México. mayo, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 102-Oriente del departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutela del Dr. José Francisco Torres Quiroz.

Agradezco la dirección, la dedicación y el interés del Dr. José Francisco Torres Quiroz en ayudarme a planear, ejecutar y concluir mi proyecto de Maestría en Ciencias Bioquímicas.

Agradezco las habilidades y los conocimientos técnicos que me enseñaron tanto la anterior técnica académica del laboratorio, la Dra. Paola Moreno Álvarez, y el Dr. Emilio Espinoza Simón, quién ocupa el puesto actualmente.

Agradezco al Dr. Roberto Coria Ortega y los integrantes de su laboratorio: la Dra. Laura Kawasaki, Diana García e Iris Hernández por enseñarme a utilizar el lector de membranas Li-Cor y el microscopio Olympus BX-51, por el préstamo de reactivos y por permitirme hacer uso de ellos cuando lo necesité.

Agradezco a la Dra. Alicia González Manjarrez, al Dr. José Carlos Campero Basaldúa, su técnico académico y a la alumna Cecilia Carretero Camberos por el préstamo de reactivos y de equipos espectrofotométricos.

Agradezco al laboratorio de la Dra. María Soledad Funez Arguello, a su técnico académico la Dra. Ariann Elizabeth Mendoza Martinez y al doctorante Hilario Ruelas Ramírez por el préstamo de anticuerpos y por sus consejos sobre la técnica del western-blot.

Agradezco a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular liderada por la Dra. Laura Ongay Larios por el libre acceso al uso de equipos como el Nanodrop.

Agradezco la revisión, la atención y los comentarios de mis sinodales, la Dra. Helena Porta Ducoing, el Dr. Roberto Coria Ortega, la Dra. Martha Patricia Coello Coutiño, el Dr. Jesús Aguirre Linares y la Dra. Sobeida Sánchez Nieto.

Este proyecto fue financiado a través del programa UNAM-PAPIIT IN209219 y IN208922.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	4
ABREVIATURAS	6
MARCO TEÓRICO	11
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio	11
Metabolismo energético de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
Estrés oxidativo en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
Especies reactivas de oxígeno (ERO).....	13
Especies reactivas de azufre (ERS)	14
Estrés oxidativo y las cisteínas.....	15
Modificaciones postraduccionales (MPT) en cisteínas.....	16
S-sulfenilación (PSOH)	17
La S-sulfenilación (PSO ₂ H) y la S-sulfonilación (PSO ₃ H).....	18
La S-persulfuración (PSSH)	18
Factores de transcripción involucrados en la respuesta al estrés oxidativo ...	20
Proteínas antioxidantes.....	21
Glutación (GSH).....	23
ANTECEDENTES	24
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
METODOLOGÍA	29
Marcaje de proteínas sulfeniladas.....	29
Marcaje de proteínas persulfuradas mediante el switch de biotina	30
Determinación de la concentración mínima del H ₂ O ₂ y del tiempo de exposición que afecte la S-sulfenilación y la S-persulfuración de las proteínas de <i>S. cerevisiae</i>	32
Efecto del H ₂ O ₂ en la S-sulfenilación y la S-persulfuración en las proteínas de <i>S. cerevisiae</i> en fase exponencial y en fase estacionaria.....	32
Extracción de proteínas para tratamientos <i>in vitro</i>	32
Sulfenilación <i>in vitro</i>	33
Persulfuración <i>in vitro</i>	33
Cuantificación de proteínas	34
SDS-PAGE.....	34
Tinción de Coomassie.....	35
Western blot.....	35
Tinción de Ponceau	36
Determinación de viabilidad celular	36
RESULTADOS	38
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	63
PERSPECTIVAS	64
REFERENCIAS	65
ANEXOS	76
Anexo 1. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas por ABC..	76

Anexo 2: Efecto del peróxido de hidrógeno en células de <i>S. cerevisiae</i> en fase exponencial y en fase estacionaria.....	77
Anexo 3: Análisis del volumen de banda por ImageJ de los resultados por western-blot.....	78
Anexo 4: Materiales y equipos.....	85
Anexo 5: Secuencia FASTA de Ssc1 (mtHSP70)	91

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1: Condiciones de uso de anticuerpos.

Tabla 2. Predicción por pCysMod de MPTox en residuos de cisteína de GAPDH de *S. cerevisiae*.

Tabla 3. Valores de la curva de calibración para la cuantificación de proteínas por ABC utilizando ABS como estándar.

Tabla 4. Área de la fracción A de la figura 22 y el cambio relativo con el grupo control (0 mM H₂O₂).

Tabla 5. Área de la fracción B de la figura 22 y el cambio relativo con el grupo control (0 mM H₂O₂).

Tabla 6. Área de la fracción C de la figura 22 y el cambio relativo con el grupo control (0 mM H₂O₂).

Tabla 7. Área de la fracción A de la figura 23 y el cambio relativo con el grupo control (0 min).

Tabla 8. Área de la fracción B de la figura 23 y el cambio relativo con el grupo control (0 min).

Tabla 9. Área de la fracción C de la figura 23 y el cambio relativo con el grupo control (0 min).

Tabla 10. Área total de la figura 24 y el cambio relativo con el grupo control (0 min) en la misma fase celular.

Tabla 11. Área total de la figura 24 y el cambio relativo con el grupo control (0 min) en la misma fase celular.

Tabla 12. Área de la banda señalada en la figura 25 y el cambio relativo con el grupo control (0 min) en la misma fase celular y la fase exponencial.

Tabla 13. Reactivos.

Tabla 14. Anticuerpos.

Tabla 15. Equipos.

FIGURAS

Figura 1. Modificaciones postraduccionales en residuos de cisteínas por oxidación

Figura 2. Síntesis de S-persulfuración

Figura 3. Protección brindada por la S-persulfuración ante la sobre-oxidación de proteínas

Figura 4. Switch de biotina para S-sulfenilación.

Figura 5. Switch de biotina para S-persulfuración.

Figura 6. Alineamiento entre GAPDH de *Homo sapiens* (P04406) y GAPDH de *S. cerevisiae* (P00360) por Omega Clustal.

Figura 7. S-sulfenilación *in vitro*.

Figura 8. S-persulfuración *in vitro*.

Figura 9: Eficacia de la tinción con Azul de Tripano.

Figura 10. Evaluación de la viabilidad celular con Azul de Tripano de células de *S. cerevisiae* en fase exponencial con y sin 10 mM de H₂O₂ por 10 minutos

Figura 11. Evaluación de la viabilidad celular con Azul de Tripano de células de *S. cerevisiae* en fase estacionaria con y sin 10 mM de H₂O₂ por 10 minutos

Figura 12. Efecto en la S-sulfenilación del tratamiento con 0, 2.5, 5, 7.5 y 10 mM de H₂O₂.

Figura 13. Efecto de 0-2.5 mM de H₂O₂ en Pgk1 y GAPDH.

Figura 14. S-sulfenilación a diferentes concentraciones de H₂O₂ (0, 0.5 y 1 mM).

Figura 15. S-sulfenilación generada por diferentes tiempos de exposición a 1 mM H₂O₂.

Figura 16. Diferencias entre la S-sulfenilación de células en fase exponencial y fase estacionaria.

Figura 17. Comparación de la S-sulfenilación de *S. cerevisiae* en fase exponencial y fase estacionaria con 1 mM de H₂O₂

Figura 18. Comparación de la S-persulfuración de *S. cerevisiae* en fase exponencial y fase estacionaria con 1 mM de H₂O₂.

Figura 19. Efecto del H₂O₂ en la síntesis de la S-persulfuración en mamíferos.

Figura 20. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas por ABC utilizando ABS como estándar.

Figura 21. Esquema de la metodología para evaluar la fase exponencial y la fase estacionaria en *S. cerevisiae*.

Figura 22. Análisis del marcaje de S-sulfenilación a 0, 0.5 y 1 mM H₂O₂ por ImageJ.

Figura 23. Análisis del marcaje de S-sulfenilación a 0, 3 y 10 minutos de exposición con 1 mM H₂O₂ por ImageJ.

Figura 24. Análisis del marcaje de S-sulfenilación en proteínas de células en fase exponencial y fase estacionaria con 1 mM H₂O₂ por ImageJ.

Figura 25. Análisis del marcaje de S-persulfuración en proteínas de células en fase exponencial y fase estacionaria con 1 mM H₂O₂ por ImageJ.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico	MMTS	Metil metanotiosulfonato
ABC	Ácido bicinconínico	MPT	Modificación postraduccional
ATC	Ácido tricloroacético	MPTox	Modificación postraduccional por oxidación
ASB	Albúmina de suero bovino	MST	Mercapto-piruvato sulfurtransferasa
AD	Amortiguador desnaturalizante	NaHS	Hidrosulfuro de sodio
CBS	Cistationina- β -sintasa	NBF-Cl	4-cloro-7-nitrobenzofurazan
CSE	Cistationina- γ -liasa	NO	Óxido nítrico
DMSO	Dimetilsulfóxido	PAGE	Electroforesis de geles de poliacrilamida
DO	Densidad óptica	Prx	Peroxirredoxinas
DTT	Ditiotreitol	PSA	Persulfato de amonio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	PSH	Grupo funcional tiol
ERN	Especies reactivas de nitrógeno	PSNO	Nitrosotiol
ERO	Especies reactivas de oxígeno	PSO ₂ H	S-sulfinilación
ERS	Especies reactivas de azufre	PSO ₃ H	S-sulfonilación
GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa	PSOH	S-sulfenilación
GPx	Glutation peroxidasas	PSSH	S-persulfuración
GSH	Glutación	PVDF	Fluoruro de polivinilideno
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno	rpm	Revoluciones por minuto
H ₂ S	Sulfuro de hidrógeno	RSH	Tiol de bajo peso molecular
H ₂ Sn	Polisulfuro	RSO ₂ H	Ácido sulfínico
IAM	Iodoacetamida	RSO ₃ H	Ácido sulfónico
		RSOH	Ácido sulfénico
		RSSH	Persulfuro

SDS Dodecilsulfato sódico
SOD Superóxido dismutasas

RESUMEN

La S-sulfenilación y la S-persulfuración son modificaciones postraduccionales (MPT) que ocurren en residuos de cisteína, como producto de la reacción entre el grupo tiol de la cisteína y un agente oxidante. En eucariontes como los mamíferos y las plantas, ambas MPT están involucradas en el mecanismo de señalización redox, sin embargo, no se han estudiado en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En este trabajo realizamos el primer acercamiento al comportamiento de ambos tipos de MPT en esta levadura. Nos enfocamos principalmente en estudiar dos condiciones que podrían provocar cambios en los perfiles de proteínas modificadas: la respuesta al H₂O₂ y diferentes fases de crecimiento. Para analizar los perfiles de S-sulfenilación o S-persulfuración en estas condiciones, extrajimos las proteínas de las células de *S. cerevisiae*, marcamos los tioles modificados con biotina e identificamos el perfil de proteínas modificadas por medio de Western-blot con anticuerpos anti-biotina. Encontramos que la S-sulfenilación y la S-persulfuración son procesos dinámicos dependientes de la fase metabólica, así como de la presencia o ausencia del H₂O₂ en el ambiente.

ABSTRACT

S-sulfenylation and S-persulfidation are post-translational modifications (PTMs) that occur on cysteine residues as a reaction product between the cysteine thiol group and an oxidizing agent. In eukaryotes like mammals and plants, both MPT are involved in the redox signaling mechanism, these MPTs have not been studied in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In this work we make the first approach to the behaviour of both types of PTM in this yeast. We mainly focused on studying two conditions that could cause changes in the profiles of modified proteins: the response to H₂O₂ and different growth phases. To analyze the profiles of S-sulfenylation or S-persulfidation under these conditions, we extracted the proteins of *S. cerevisiae* cells, labeled the modified thiols with biotin and identified the profile of modified proteins by Western-blot with anti-biotin antibodies. We found that S-sulfenylation and S-persulfidation are dynamic processes dependent on the metabolic phase, as well as the presence or absence of H₂O₂ in the environment.

INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo es relevante en el estudio de la fisiología celular por ser un fenómeno que desencadena reacciones de oxido-reducción en biomoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (eFarrugia & eBalzan, 2012). Tal es el caso de las modificaciones post-traduccionales (MPT) que se generan en las proteínas por oxidación, específicamente en residuos de cisteínas (Alcock et al., 2018).

Las afectaciones que se producen por las MPT por oxidación varían de proteína a proteína y dependen del tipo de modificación. Estas modificaciones en algunos casos se producen con la finalidad de reducir compuestos oxidantes como el H_2O_2 y en otros casos pueden ocasionar la pérdida de función proteica (Alcock et al., 2018).

A la fecha se han descubierto varias modificaciones en residuos de cisteína relacionadas con la oxidación, tales como la sulfenilación, la sulfinilación y la sulfonilación, generadas por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la persulfuración dada por el sulfuro de hidrógeno (H_2S), la nitrosilación causada por el óxido nítrico (NO) y la glutatiónilación por el péptido antioxidante, glutatión (Alcock et al., 2018).

Se ha demostrado que la sulfenilación es una reacción reversible, sin embargo, si el agente oxidante continúa presente puede pasar a una sulfinilación o una sulfonilación, perdiendo su reversibilidad (Kriznik et al., 2020). Recientemente se ha descrito que la persulfuración podría proteger a la célula en presencia de niveles altos de agentes oxidantes sin perder su capacidad de regresar a su estado basal una vez que disminuye el estrés oxidativo (Dóka et al., 2020).

Por lo anterior, estudiamos la dinámica de la S-persulfuración y la S-sulfenilación de residuos de cisteína en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* sometida a un estrés oxidativo por H_2O_2 y su comportamiento de la misma en la fase exponencial y la fase estacionaria de su curva de crecimiento.

MARCO TEÓRICO

***Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio**

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un eucarionte unicelular empleado como modelo de investigación desde hace casi un siglo en el área de la salud y la industria gracias a sus mecanismos celulares. Además, es un organismo fácilmente cultivable en un medio controlado que permite al investigador estudiar diferentes condiciones como lo es la variedad de nutrientes, presencia y ausencia de agentes y/o ambientes estresantes (agentes oxido-reductores, choque térmico, choque osmótico, entre otros). Además, es posible manipular su estado fisiológico para analizar un fenómeno en específico (Sherman, 2002).

Además, la principal ventaja que tiene *S. cerevisiae* como modelo de estudio es la información recabada en casi cien años de investigación. El primer reporte donde se empleó a la levadura está situado a mediados de los 1930s. En 1949 se publicó su primer mapa genético, pero no fue hasta 1996 que se obtuvo la secuencia de su genoma completo, el cual está constituido por 12,052 kb distribuidas en 16 cromosomas y en más de 5.7×10^3 genes que codifican proteínas, las cuales se han estudiado exhaustivamente y su información se encuentra recopilada en bases de datos de acceso libre (Sherman, 2002).

Aunque los datos anteriores pueden indicar que se conoce en su totalidad a este microscópico organismo, aún existen interrogantes en su fisiología que podría ayudar a resolver problemáticas actuales del área industrial (procesos fermentativos) (Berterame et al., 2018) y del área de la salud, pues se sabe que al menos el 30 % de los genes relacionados con enfermedades humanas tienen ortólogos en levadura (Mager & Winderickx, 2005).

Metabolismo energético de *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es un organismo cuyo metabolismo se modifica dependiendo de los nutrientes que se encuentran en el medio en el que se encuentran creciendo. Cuando hay glucosa disponible, la célula crece de manera

exponencial por medio de la fermentación. Una vez que la glucosa se consume, la célula pasa por un cambio diáuxico donde modifica su perfil proteico a uno que asegure la formación de energía por medio de la respiración celular. Conforme los nutrientes disminuyen, la célula deja de reproducirse y se detiene en fase G₀ del ciclo celular, la cual se considera la fase estacionaria (Werner-Washburne & Singer, 1993).

Las principales diferencias en la estructura de la célula entre la fase exponencial y la fase estacionaria son la pared celular y las mitocondrias. En las células en fase exponencial la pared es más delgada, con más poros y por lo mismo tiene mayor permeabilidad (Sousa-Lopes et al., 2004). Además, las células en fase estacionaria presentan mayor cantidad de mitocondrias estructuralmente más redondas que en fase exponencial (Werner-Washburne & Singer, 1993).

Sin embargo, las células de la levadura en fase estacionaria pueden recuperar su crecimiento exponencial cuando se adicionan nutrientes al medio de cultivo (Werner-Washburne & Singer, 1993).

Estrés oxidativo en *Saccharomyces cerevisiae*

Como se mencionó anteriormente, las células de *S. cerevisiae* se utilizan para analizar fenómenos fisiológicos por la homología que tienen sus proteínas con mamíferos como el humano y por la facilidad con la que se puede manipular su medio de cultivo. El estrés oxidativo es uno de estos fenómenos del cuál la levadura ha servido de modelo de estudio para poder comprenderlo mejor.

De manera basal, en toda actividad metabólica de la célula se producen compuestos oxido-reductores con capacidad oxidativa o antioxidante. Sin embargo, existen situaciones en las que los compuestos oxidantes como las especies reactivas de oxígeno (ERO), de nitrógeno (ERN) y de azufre (ERS) prevalecen. A este fenómeno se le conoce como estrés oxidativo (Auesukaree, 2017).

La relevancia del estudio de este fenómeno radica en las afectaciones que tiene en las biomoléculas de la célula. De entre ellas sobresalen las proteínas y

los ácidos desoxirribonucleicos (ADN). En el ADN la oxidación puede producir mutaciones en sus bases y en las proteínas se pueden generar modificaciones post-traduccionales que afectan su estructura y/o su actividad (eFarrugia & eBalzan, 2012; Wang et al., 2014).

El estrés oxidativo puede generarse de manera endógena (actividad enzimática) (Wang et al., 2014) o exógena (exposición a metales pesados, irradiación ultravioleta, herbicidas, contaminantes del aire, xenobióticos, entre otros) (eFarrugia & eBalzan, 2012). En las levaduras existen dos factores principales que promueven el desarrollo del estrés oxidativo: su crecimiento en un ambiente aeróbico y su capacidad de formar biomasa (Berterame et al., 2018). Sin embargo, las mismas levaduras tienen un sistema de regulación que les ayuda a controlar las concentraciones de oxidantes intracelulares. Los mecanismos que utiliza se pueden dividir en enzimáticos y no enzimáticos (Auesukaree, 2017).

Especies reactivas de oxígeno (ERO)

En un mundo cuya composición atmosférica tiene el 21 % de oxígeno (Liu et al., 2019), los organismos que habitan en él en su mayoría lo utilizan como último aceptor electrónico en la producción de energía.

Aunque el oxígeno ayuda a mantener la vida, su capacidad oxidante propicia la generación de compuestos tóxicos durante la respiración aerobia llamados ERO (eFarrugia & eBalzan, 2012). Entre las ERO se encuentran los radicales superóxidos, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo (eFarrugia & eBalzan, 2012), el óxido nítrico y el peroxinitrito (Alcock et al., 2018). Estas se generan principalmente por la fuga de electrones del oxígeno molecular en la cadena transportadora de electrones (eFarrugia & eBalzan, 2012). También son generados en el retículo endoplasmático y en los peroxisomas cuando utilizan al oxígeno como último aceptor electrónico (Auesukaree, 2017). Por ejemplo, en el retículo endoplasmático existe una chaperona llamada Ero1 que ayuda a la formación de puentes disulfuro dentro de la proteína al mismo tiempo que forma una molécula de peróxido (Wang et al., 2014)

Estos compuestos oxidantes no solo generan daños a la célula, en bajas concentraciones pueden servir como señalizadores redox. Tal es el ejemplo del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) descubierto en el siglo XVIII, inicialmente se caracterizaba por desintegrarse en la sangre, en 1920 se le atribuyeron propiedades bactericidas, pero no fue hasta 1970 cuando se empezó a descubrir que este compuesto también tenía un papel en el metabolismo de la célula (Sies, 2017).

La reactividad del H_2O_2 con otros compuestos facilita la transmisión de señales dentro de la célula, principalmente en respuesta al estrés oxidativo (Sies, 2017). La señalización de la oxidación por H_2O_2 se conserva en células procariontas y eucariontas, así como en organismos unicelulares y pluricelulares. Entre las proteínas señalizadoras se encuentran los factores de transcripción de la levadura (Yap1), de bacterias (OxyR y PerR) y de células de mamífero (AP-1, NRF2, entre otros) (Sies, 2017; Stone & Yang, 2006).

Especies reactivas de azufre (ERS)

De igual manera a las especies de oxígeno, existen otra variedad de moléculas reactivas que intervienen en procesos de regulación y de señalización cuyo elemento principal es el azufre. Entre estas moléculas se encuentran compuestos de baja estabilidad como el sulfuro de hidrógeno (H_2S), los tioles de las cisteínas (PSH), los tioles de bajo peso molecular (RSH), los persulfuros (RSSH), las proteínas persulfuradas (PSSH), los ácidos sulfénicos (RSOH), los ácidos sulfínicos (RSO_2H), los ácidos sulfónicos (RSO_3H), los nitrosotioles (PSNO) y los polisulfuros (H_2S_n ; $n > 2$) (Kolluru et al., 2020).

El principal exponente de las ERS es el sulfuro de hidrógeno (H_2S). Un gas producido en las levaduras durante la fermentación (Huang et al., 2017) y en células de mamífero se ha comprobado que es producido en respuesta a H_2O_2 (Zivanovic et al., 2019).

Anteriormente se consideraba un veneno por generar un alto nivel de inflamación en personas expuestas a él. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que en bajas concentraciones tiene efectos beneficiosos para la

salud, pues interviene en la vasodilatación coronaria y en la circulación de la sangre periférica, por citar unos ejemplos (Filipovic et al., 2018).

En mamíferos, este compuesto se encuentra en su forma aniónica HS⁻ y se sintetiza gracias a las enzimas cistationina-β-sintasa (CBS), cistationina-γ-liasa (CSE) y mercapto-piruvato sulfurtransferasa (MST) a partir de cisteínas y moléculas homólogas. En la levadura se conserva esta vía de síntesis del H₂S con las proteínas Cys3 (homóloga a CSE) y Cys4 (homóloga a CBS) (Alcock et al., 2018).

En las levaduras, además de la ruta presente en los mamíferos de degradación de las cisteínas por CBS, CSE y MST, producen al H₂S por la fijación del azufre durante la fermentación. Adquieren el sulfato del ambiente usando los transportadores Sul1p y Sul2p, luego el sulfato se convierte en 5'-adenililsulfato gracias a la ATP sulfurilasa (Met3p), después se fosforila por la APS cinasa (Met14p) y posteriormente se reduce por la APS reductasa (Met16p) y la sulfito reductasa (Met5p/Met10p), resultando en el sulfuro de hidrógeno (Huang et al., 2017).

Estrés oxidativo y las cisteínas

Las ERO y las ERS comparten un mismo blanco, las cisteínas de las proteínas. Aproximadamente el 1.2 % de los aminoácidos en las proteínas son cisteínas, considerándose el aminoácido menos frecuente en *S. cerevisiae* (Miseta & Csutora, 2000) y estas pueden presentar una oxidación desde -2 hasta +6 (Alcock et al., 2018) por lo que son consideradas reguladoras redox de la función proteica (Zivanovic et al., 2019).

A pesar de su baja incidencia, las cisteínas constituyen al segundo lugar en aminoácidos cuyas mutaciones desencadenan enfermedades. Lo anterior se debe a que la unión entre cisteínas forman puentes disulfuros, los cuales intervienen en el plegamiento y la estabilidad de las proteínas, así como en la localización celular de ellas (Erdős et al., 2019).

Las cisteínas se pueden comportar como neutrófilos o agentes reductores cuando tienen sus grupos tioles libres, pero cuando se oxidan hasta formar

puentes disulfuro se vuelven electrófilos o agentes oxidantes (Alcock et al., 2018).

Los residuos de cisteína se caracterizan por tener presente en su ramificación a un tiol libre o radical tiilo. Este grupo funcional es susceptible a tener modificaciones postraduccionales por oxidación y transformarse en S-nitrosotioles, ácidos sulfénicos, ácido sulfínicos, ácidos sulfónicos, sulfenamidas, persulfuros, puentes de dos o más sulfuros (Alcock et al., 2018; Capdevila et al., 2021).

Los tioles de las cisteínas varían su pKa con respecto a los aminoácidos que lo rodean. Usualmente su pKa ronda entre los 8-9, por lo que a pH fisiológico suelen protonarse, por lo cual son menos susceptibles a una oxidación por H₂O₂ (Alcock et al., 2018).

Modificaciones postraduccionales (MPT) en cisteínas

La reacción entre una cisteína y las ERO y/o las ERS producen una modificación postraducciona l en el grupo tiol de la cisteína, que depende del tipo de especie y del ambiente en que se lleva la reacción. Cuando una cisteína reacciona con el H₂O₂ genera una S-sulfenilación (PSOH), una S-sulfinilación (PSO₂H) o una S-sulfonilación (PSO₂H), dependiendo de la intensidad de la oxidación, y cuando una cisteína oxidada reacciona con una ERS como el H₂S genera una S-persulfuración (PSSH) (Alcock et al., 2018). En la figura 1 se esquematizan todas las modificaciones de las cisteínas por oxidación.

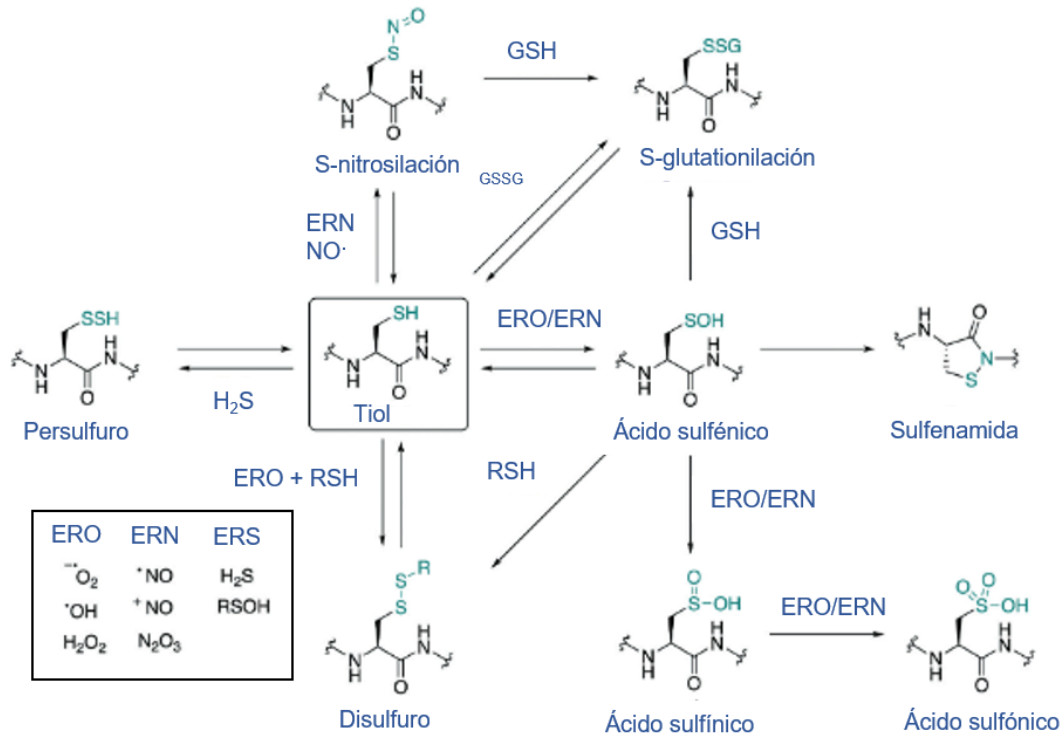


Figura 1. Modificaciones postraduccionales en residuos de cisteínas por oxidación (Alcock et al., 2018).

S-sulfenilación (PSOH)

La sulfenilación es un estadio temprano de oxidación de los residuos de cisteínas por las ERO y las ERN. Los ácidos sulfénicos son electrófilos inestables que reaccionan fácilmente con otros compuestos oxidados para formar puentes disulfuros (Alcock et al., 2018).

Esta modificación permite la señalización entre proteínas en respuesta a compuestos oxidantes. Algunas de las proteínas que adquieren S-sulfenilación son las proteínas antioxidantes como las peroxirredoxinas, las cuales requieren de una S-sulfenilación para formar un puente disulfuro que posteriormente es eliminado por las tioredoxinas (Gupta & Carroll, 2014). Otro ejemplo, es la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), una enzima que participa en la glucólisis y que al modificarse por S-sulfenilación disminuye tanto su actividad como de la ruta metabólica. Este cambio permite que la glucosa se destine a

alimentar la ruta de las pentosas fosfato para producir al agente reductor NADP y contribuir al mecanismo antioxidante de la célula (Peralta et al., 2015).

Para identificar los ácidos sulfénicos se han utilizado técnicas donde se bloquean los tioles libres con un compuesto como la maleimida o iodoacetamida, luego se reducen los RSOH con arsenito de sodio o ditionitrito (DTT) y al final se marcan los tioles resultantes con biotina, la cuál puede detectarse con anticuerpos (Alcock et al., 2018).

Recientemente se han empleado nuevas metodologías para su identificación. Entre ellas sobresalen las que utilizan su propiedad de electrófilo. Esta cualidad facilita su identificación al reaccionar con un buen nucleófilo como la dimedona, el cual se detecta con anticuerpos y el NBF-Cl (4-cloro-7-nitrobenzofurazan) que da fluorescencia (Zivanovic et al., 2019).

La S-sulfinilación (PSO₂H) y la S-sulfonilación (PSO₃H)

Los ácidos sulfínicos y los ácidos sulfónicos son considerados estados sobreoxidados de un tiol. Estos son formados gracias a una reacción lenta de un ácido sulfénico con H₂O₂ u otra ERO. Sin embargo, en casos específicos la sulfinilación puede ser reversible, tal cuál es el caso de las peroxirredoxinas que se reducen gracias a las sulfirredoxinas (Alcock et al., 2018).

Los ácidos sulfínicos tienen un pKa aproximadamente de 2 por lo que a pH fisiológico se encuentran completamente desprotonados, volviéndose un anión nucleofílico. Con respecto a los ácidos sulfónicos, su pKa es aún menor a 2, por lo que se encuentran comúnmente en su forma cargada negativamente. Es posible detectar la sulfinilación y la sulfonilación por reacciones antígeno-anticuerpo aunque son métodos poco eficaces (Alcock et al., 2018).

La S-persulfuración (PSSH)

La persulfuración es una modificación de residuos de cisteína que puede formarse mediante diferentes rutas (figura 2). Una de ellas es a partir de un disulfuro más el radical HS⁻ para formar un tiol y el persulfuro. Otra vía es a base de un ácido sulfénico o nitrosotiol y el radical HS⁻. Por último, está la formación a

base de polisulfuros o sulfuros de azufre y el tiol de una cisteína (Alcock et al., 2018).

Una proteína persulfurada (PSSH) es difícil de estudiar por tener una reactividad similar a una proteína con cisteínas reducidas (PSH) y sulfeniladas (PSOH). Por ello es por lo que Zivanovic y su equipo desarrollaron un método en el que utilizaban un compuesto como NBF-Cl que reacciona con tanto PSSH como PSOH bloqueando a los ácidos sulfénicos y convirtiendo al enlace disulfuro en un electrófilo que reaccione directamente con la dimedona o similares, por ejemplo, DYn-2 (4-pent-4-inil-1,3-ciclohexandiona), DAz-2 (4-(3-azidopropil)1,3-ciclohexanodiona) y DCP-Bio1 (3-(2,4-dioxociclohexil)propil-5-((3aR,6S,6aS)-hexahidro-2-oxo-1H-tieno[3,4-d]imidazol-6-il)pentanoato) (Zivanovic et al., 2019).

Los persulfuros tienen un pKa aproximadamente de 1-2 unidades menos que su tiol correspondiente por lo que son ácidos fuertes fácilmente desprotonables a pH fisiológico (Alcock et al., 2018).

Un persulfuro protonado es un electrófilo, a comparación del desprotonado que es un nucleófilo más fuerte que el tiol que le corresponde (Benchoam et al., 2020). Una vez que está protonado, los nucleófilos pueden atacar tanto al átomo de azufre γ o δ (Alcock et al., 2018).

Los persulfuros pueden reaccionar con nucleófilos como el glutatión que tiene una cisteína en su composición. Si reaccionan con el átomo de azufre γ se produce un disulfuro y se libera H_2S , pero si se ataca el átomo delta se regenera el tiol de la cisteína y se forma un nuevo persulfuro en el nucleófilo (Alcock et al., 2018).

La persulfuración se va perdiendo conforme envejecen los organismos e incrementa gracias a los mismos mecanismos que alargan la esperanza de vida, por lo que existe relación entre la persulfuración y la longevidad de las células (Zivanovic et al., 2019).

La reacción de persulfuración o sulfhidración de cisteínas es reversible y puede afectar la actividad de las proteínas, tanto de activación como de inactivación. Por ejemplo, está la inhibición de la proteína tirosin fosfatasa 1B, la

hiperpolarización del canal de potasio sensible a ATP, la potenciación de la polimerización de actina y la activación del factor nuclear KB (NF-KB) (Alcock et al., 2018).

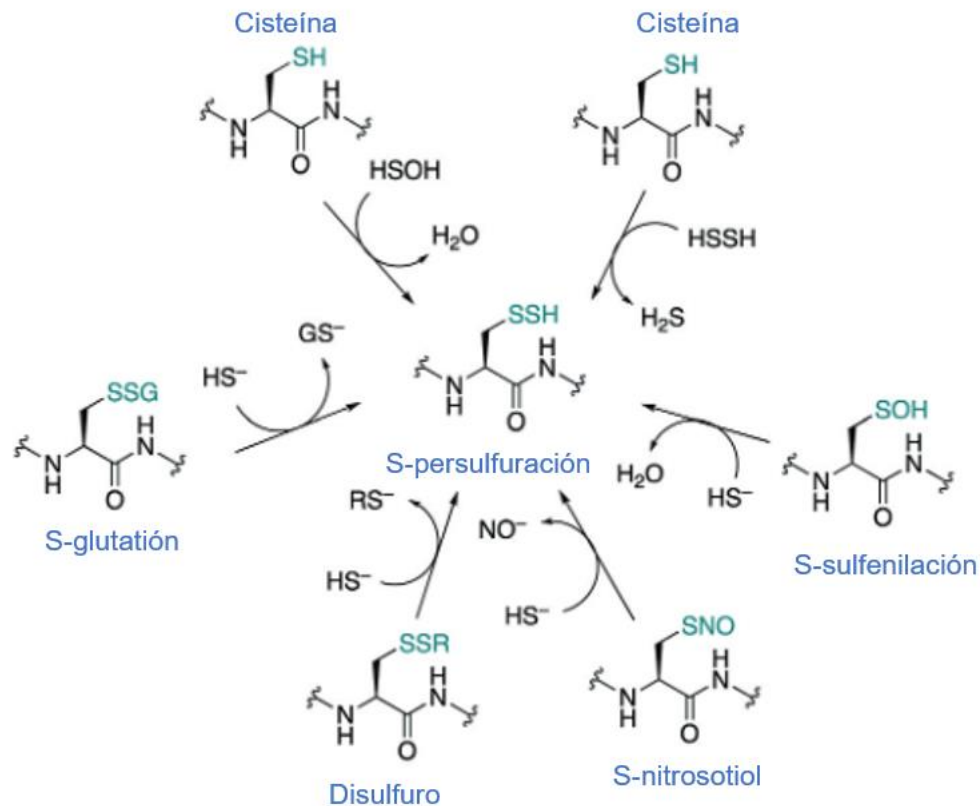


Figura 2. Síntesis de S-persulfuración (Alcock et al., 2018). HSOH: ácido sulfénico; HSSH: polisulfuro; HS^- : anión hidrosulfuro; NO^- : anión nitroxilo GS^- : anión tiol glutatión.

Factores de transcripción involucrados en la respuesta al estrés oxidativo

Como se mencionó anteriormente en el apartado de las levaduras y el estrés oxidativo, *S. cerevisiae* tiene diversos sistemas para combatir al estrés oxidativo y regular la concentración de compuestos oxidantes y reductores (Auesukaree, 2017).

Existen cuatro factores de transcripción principales que se encargan de regular la expresión de los genes que codifican para las enzimas con capacidad antioxidante mencionada previamente: Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4 (eFarrugia & eBalzan, 2012). El principal factor transcripcional activado por el estrés oxidativo

es Yap1 (por sus siglas en inglés “yeast activator protein”). Tiene un análogo en mamíferos llamado c-Jun (eFarrugia & eBalzan, 2012) y en bacterias llamado OxyR (Okazaki et al., 2007). Yap1p reconoce al elemento YRE en la secuencia 5'-TT/GAC/GTC/AA-3' lo cual desencadena la expresión de proteínas antioxidantes como la GSH1 (gamma-glutamilcistein sintetasa), la GSH2 (GSH sintetasa), la TRX2 (tioredoxina), la SOD1 (superóxido dismutasa citosólica) y la SOD2 (superóxido dismutasa mitocondrial) (eFarrugia & eBalzan, 2012).

Otro factor transcripcional que se activa ante el estrés oxidativo es Skn7. Entre las proteínas que ayuda a regular están las tioredoxinas reductasas codificadas en el gen TRR1, TRX (eFarrugia & eBalzan, 2012), las peroxirredoxinas, como la Tsa1, al factor transcripcional Msn4 (Maclsaac et al., 2006) y la glutatión peroxidasa (GPX2) (eFarrugia & eBalzan, 2012; Hu et al., 2007).

Por último, están los factores transcripcionales Msn2 y Msn4 que funcionan en respuesta al estrés oxidativo. Tienen un dominio de dedos de zinc para reconocer la secuencia STRE 5'-CCCCT-3' del ADN para regular la expresión de dos antioxidantes importantes: la catalasa citosólica (CTT1) y la glutarredoxina (GRX1) (eFarrugia & eBalzan, 2012).

Proteínas antioxidantes

Las enzimas antioxidantes de mayor importancia en la levadura *S. cerevisiae* son las superóxido dismutasas (SOD), las catalasas, las peroxirredoxinas (Prx) y las glutatión peroxidasa (Gpx).

Las SOD son enzimas cuya función catalítica es dismutar los radicales superóxidos (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y dioxígeno (oxígeno molecular) (Freitas et al., 2000). *S. cerevisiae* tiene dos SOD, la enzima mitocondrial Sod1 (MnSOD) codificada por *SOD1* y la enzima citosólica Sod2 (CuZnSOD) codificada por *SOD2* (Freitas et al., 2000).

Las SOD protegen a las enzimas con grupos 4Fe-4S a que se oxide el hierro y por ende evitando su liberación del conjunto. Si el hierro de estas enzimas

se oxidara perdería función y generaría daño oxidativo de otros compuestos aledaños (Freitas et al., 2000).

Las catalasas son las enzimas que tienen un grupo hemo utilizado para catalizar la reacción de dismutación del H_2O_2 a H_2O y O_2 . En las levaduras hay dos catalasas, la catalasa peroxisomal A (Cta1) codificada por el gen *CTA1* y la catalasa citosólica T (Ctt1) codificada por *CTT1*. Cta1 se induce para eliminar al H_2O_2 que se genera en consecuencia a la β -oxidación de los ácidos grasos y por el otro lado, Ctt1 se induce en respuesta a estrés por calor, osmótico, privación de nutrientes y por estrés causado por H_2O_2 (Grant et al., 1998).

Con respecto a las peroxirredoxinas, estas están relacionadas con la extensión de la esperanza de vida en levaduras, principalmente la Tsa1, otorgando mayor resistencia al peróxido de hidrógeno (Roger et al., 2020).

Las peroxirredoxinas son dímeros obligados que cargan dos residuos catalíticos de cisteína con los cuales forma puentes disulfuros. En la Tsa1 está la Cys48 que es su residuo peroxidático (C_P) y Cys171, su residuo resolvente (C_R). La C_P se oxida para reducir al H_2O_2 y una vez oxidada forma un enlace disulfuro con C_R de otra subunidad de la Tsa1. Los enlaces disulfuro de las peroxirredoxinas se reducen gracias a las tioredoxinas (Roger et al., 2020).

La Tsa1 ayuda a alargar la esperanza de vida por medio de la modulación de la ruta cAMP-PKA, no por su poder de metabolismo del H_2O_2 . La vía cAMP-PKA se enfoca en el crecimiento celular y al mismo tiempo inhibe factores de transcripción de respuesta al estrés oxidativo como Msn2 y Msn4. Cuando la Tsa1 inhibe la subunidad Tpk1 de la PKA, disminuye el crecimiento de *S. cerevisiae*, pero aumenta su actividad antioxidante y aumenta su esperanza de vida (Roger et al., 2020).

Por último están las glutatión peroxidasas, las cuales son enzimas que al igual que las catalasas, su función es descomponer al peróxido de hidrógeno en agua y en oxígeno, sin embargo, las GPx requieren del glutatión para llevar a cabo esta reducción (Inoue et al., 1999).

Glutación (GSH)

El glutación es un tripéptido formado por glutamato, cisteína y glicina que tiene un papel importante en la regulación celular redox. Es uno de los tioles de bajo peso molecular más abundante en las células (Grant et al., 1998) con 90 mg/L (Cha et al., 2004). Se sintetiza en el citosol por la enzima γ -glutamylcistein sintetasa (GCS) y la glutación sintetasa (GS). La GCS es inactivada por altas concentraciones de GSH (Alcock et al., 2018).

Puede existir en su forma reducida (GSH) o a manera de disulfuro (GSSG) con una relación GSH/GSSG de 100-400. Se convierte el GSSG en GSH por medio de la glutación reductasa (Alcock et al., 2018).

El glutación sirve para disminuir los radicales libres, reducción de los peróxidos y reacciona con compuestos electrófilos. Puede formarse un disulfuro entre una cisteína sulfenilada o nitrosilada del glutación con otra proteína con una cisteína desprotonada, ácido sulfénico o con nitrosotiol (Alcock et al., 2018).

ANTECEDENTES

El descubrimiento de la función del H_2O_2 y del H_2S en el metabolismo como mensajeros de la señal de la oxidación han dejado atrás la premisa de que ambas moléculas solo interactúan con la célula como agentes tóxicos.

Las MPT generadas en residuos de cisteínas inducidas por estas moléculas han revolucionado el concepto que se tiene de la oxidación de proteínas. Se han identificado una gran variedad de MPTox en cisteínas y cada una de ellas tiene una ruta de síntesis diferente, ya sea por concentración del agente oxidante o por la naturaleza de este (Figura 1, Alcock et al., 2018).

De estas modificaciones resaltamos principalmente a la S-sulfenilación, una MPTox reversible en residuos de cisteína mediada por ERO y ERN como el H_2O_2 . Su importancia radica en la versatilidad que le confiere a la regulación de la proteína que se modifica, pues su efecto varía de proteína a proteína. En la última década se ha descubierto que la S-sulfenilación es un paso intermedio para inactivar rutas como la Ras-cAMP-PKA al secuestrar a la subunidad catalítica de la PKA, la Tpk1. Cuando la Tpk1 se sulfenila, da paso a la formación de la glutationilación e inhibe su actividad, por lo que aumenta la esperanza de vida (Roger et al., 2020); también interviene en la regulación de la actividad de la GAPDH y por ende, del metabolismo de carbohidratos ante el estrés oxidativo (Peralta et al., 2015); permite la estructuración de proteínas antioxidantes como la Sod1 a que se acople con sus cofactores de zinc y cobre (Fetherolf et al., 2017); por mencionar algunos ejemplos. Estos descubrimientos han fortalecido la hipótesis de que la S-sulfenilación es una MPTox que relaciona a la respuesta al estrés oxidativo con la extensión de la esperanza de vida (Roger et al., 2020).

Por otro lado, tenemos a la S-persulfuración, una MPTox ligada al H_2S que aumenta la reactividad de la cisteína al adquirir un enlace disulfuro con características electrófilas y neutrófilas dependiendo de las propiedades del ambiente (Benchoam et al., 2020). Ha sido tema central de estudio en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, cardíacas y en el cáncer al estar presente en proteínas críticas para el buen funcionamiento del organismo

(Gupta et al., 2022; Nishimura et al., 2022; Peng et al., 2022; Xiao et al., 2020; Yang et al., 2020; Zuhra et al., 2021).

Además, su actividad no solo radica en la modificación de proteínas específicas para transmitir la señal o para permitir el buen funcionamiento de la enzima, también está involucrada en la protección de proteínas ante la sobre-oxidación de cisteínas. Se hipotetiza que la S-persulfuración reacciona de manera similar a un tiol libre ante un estímulo oxidante, generando una pertiosulfenilación (PSSOH), una pertiosulfinilación (PSSO₂H) o una pertiosulfonilación (PSSO₃H), sin embargo, al mantener el enlace disulfuro de la S-persulfuración todavía son aptos de ser reducidos por agentes reductores (figura 3, Dóka et al., 2020).

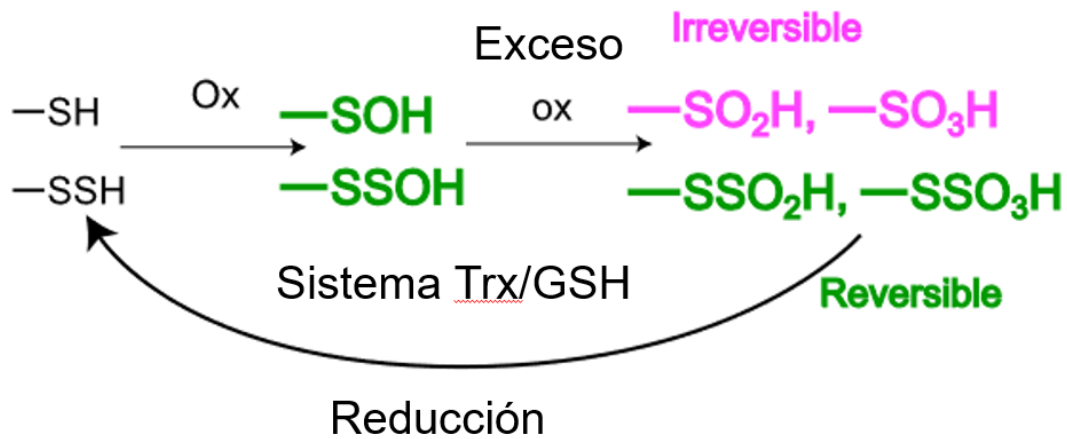


Figura 3. Protección brindada por la S-persulfuración ante la sobre-oxidación de proteínas (Dóka et al., 2020). -SH: Tiol, -SSH: S-persulfuración, Ox: Oxidación, -SOH: S-sulfenilación, -SSOH: Pertiosulfenilación, -SO₂H: S-sulfinilación, -SSO₂H: Pertiosulfinilación, -SO₃H: S-sulfonilación, -SSO₃H: Pertiosulfonilación, Trx: Tiorreoxinas, GSH: Glutación.

Agregando a lo anterior, la S-persulfuración también se ha descrito en células de mamífero donde la MPTox se produce ante el mismo estímulo que sintetiza a la S-sulfenilación, el H₂O₂ (Zivanovic et al., 2019). Pero no fue hasta el año pasado que se describió que la S-sulfenilación de CSE aumenta los niveles de síntesis del H₂S, (Wang et al., 2021) lo cuál podría explicar el aumento de la S-persulfuración. Sin embargo, no se ha comprobado experimentalmente de que este fenómeno se presente en *S. cerevisiae* (Wang et al., 2021).

A pesar de que la información que se cuenta de estas MPTox incrementó considerablemente en la última década, no hay datos de ellas en la levadura *S. cerevisiae* (Wang et al., 2021). Organismo modelo que ha sido utilizado en el estudio de las mismas enfermedades en las cuales están involucradas las MPTox S-persulfuración y S-sulfenilación (Daskalova et al., 2021; Mager & Winderickx, 2005), así como en el estudio de la esperanza de vida, la cuál es relacionada con la resistencia al estrés oxidativo y a los procesos antioxidantes (Daskalova et al., 2021; Roger et al., 2020; Vall-Illaura et al., 2019). Además, la facilidad con la que se puede mantener un cultivo de *S. cerevisiae* en alta tasa de reproducción o en fase estacionaria (G_0), así como las diferencias fisiológicas que presentan en ambas fases han permitido observar que hay un aumento en los mecanismos antioxidantes cuando la célula entra en senescencia en comparación de una célula que está en crecimiento continuo (Daskalova et al., 2021; Gray et al., 2004; Werner-Washburne & Singer, 1993).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) ocurre de manera fisiológica, pudiendo afectar múltiples componentes celulares. Altos niveles de ERO se han ligado a enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y cáncer. Sin embargo, todavía falta mucha información para comprender su mecanismo de acción. Centrándose solamente en las proteínas, las ERO pueden modificar sus residuos de cisteínas, generando cambios específicos. La sulfenilación y la persulfuración son dos modificaciones postraduccionales (MPT) que sobresalen por representar la oxidación inicial de las proteínas y un posible mecanismo protector ante la sobre-oxidación de las proteínas, respectivamente.

Sin embargo, la información acerca de la S-sulfenilación y la S-persulfuración en *S. cerevisiae* es mínima a pesar de ser un organismo modelo de gran importancia. Por ello proponemos un primer acercamiento a estas MPT en *S. cerevisiae* y para describir la dinámica de estas modificaciones en presencia del H₂O₂, un agente estresor que las sintetiza, así como a evaluarlas en diferentes fases metabólicas.

HIPÓTESIS

La sulfenilación y la persulfuración de proteínas debe afectarse por la presencia de agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno y por el estado metabólico celular.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la dinámica de la persulfuración y la sulfenilación de residuos de cisteína en presencia de peróxido de hidrógeno y distintos estados metabólicos en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la menor concentración de H_2O_2 y el menor tiempo de exposición que genere cambios en el proteoma sulfenilado y persulfurado en *S. cerevisiae* por western-blot.
- Comparar el proteoma sulfenilado y persulfurado en las fases exponencial y estacionaria de crecimiento en *S. cerevisiae* por western-blot.

METODOLOGÍA

Marcaje de proteínas sulfeniladas

Para extraer las proteínas se agregó ácido tricloroacético (ATC) al cultivo de *S. cerevisiae* hasta una concentración final del 20 % para detener la oxidación. Se centrifugaron las células de *S. cerevisiae* a 3100 rpm por 5 minutos a 4°C y el botón se resuspendió con 1 mL de ATC 20 %.

Se centrifugó a 3100 rpm por 5 minutos a 4°C y el botón se resuspendió con 1 mL de ATC 20 %. Se pasó la muestra a tubos de 2 mL con rosca más 0.5 g de perlas de vidrio. Se lisaron las células en agitador vortex en 10 rondas de 1 minuto en hielo y 1 minuto en vortex. El sobrenadante obtenido se transfirió a tubos de 2 mL. Para recuperar la mayor cantidad de muestra, se lavaron las perlas con 500 µL de ATC al 5 % y se juntó el sobrenadante en el tubo de 2 mL antes mencionado. Se centrifugaron a 14000 rpm por 10 min a 4°C y el sobrenadante se decantó. Para eliminar el ATC sobrante, se lavó el botón de proteínas 2 veces con 1 mL de acetona fría (-20°C) y se centrifugó por 2 minutos a 14000 rpm. Y para eliminar la acetona, se secó la muestra en el concentrador speed vac por 7 minutos (o hasta que la muestra estuviera totalmente seca).

Una vez extraídas las proteínas se realizó el marcaje de proteínas sulfeniladas con piridilditiol-biotina (HPDP-biotina) según Le Moan (Le Moan, Natacha et al., 2008) el cual consiste en bloquear los grupos tioles libres (tioles reducidos) con un agente metilante (iodoacetamida), luego se agrega ditiotreitól (DTT) para reducir las proteínas sulfeniladas a tioles libres y estos últimos son marcados al adicionar HPDP-Biotina (figura 4).

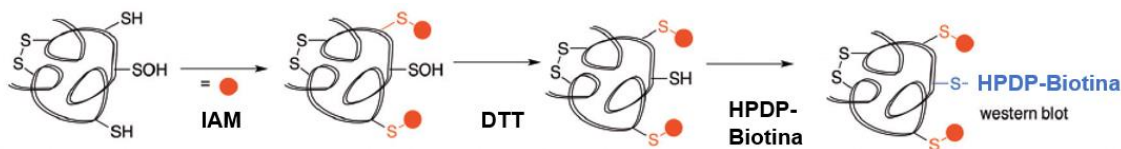


Figura 4. Switch de biotina para S-sulfenilación. IAM: Iodoacetamida; DTT: ditiotreitól; HPDP-Biotina: Piridilditiol-biotina. Imagen modificada (Alcock et al., 2018).

Para bloquear los tioles libres, se resuspendieron las muestras en 1 mL de AD (receta 3) y se agregaron 50 mM de iodoacetamida (IAM), las muestras se

mantuvieron en agitación constante (1400 rpm) por 45 min a 30°C. Para eliminar el excedente de IAM, se centrifugó por 10 minutos a 13,000 rpm, se decantó el sobrenadante, se resuspendió en 1 mL de ACT 10 % y se centrifugó por 5 minutos a 14,000 rpm. Se realizaron 2 rondas de lavado con acetona (14,000 rpm por 2 minutos) y se eliminaron los líquidos de la muestra en el concentrador speed-vac (7 minutos aproximadamente).

Se repitió el protocolo de bloqueo reemplazando a la IAM con el agente reductor DTT al 20 mM para convertir los ácidos sulfénicos de la muestra en tioles libres y por último con 0.8 mM de HPDP-Biotina en vez de IAM o DTT para bloquear todos los tioles libres provenientes de un ácido sulfénico.

Se resuspendieron las muestras en amortiguador (receta 4) y se cuantificaron proteínas con Pierce™ BCA Protein Assay Kit a 562 nm en nanodrop.

Marcaje de proteínas persulfuradas mediante el switch de biotina

Para extraer las proteínas se centrifugaron las muestras a 2400 rpm por 5 min a 4°C. El botón se resuspendió en amortiguador de lisis HEN (receta 5), se pasó a un tubo de 2 mL con tapa de rosca y se adicionaron 0.5 g de perlas de vidrio. Las células se lisaron en 10 ciclos de 30 s en vortex intercalados con 30 s en hielo. Al finalizar, se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 segundos y se separó el sobrenadante en un microtubo de 2 mL. Se centrifugaron nuevamente a 14,000 rpm por 25 min a 4°C y pasar el sobrenadante a otro tubo.

Se realizó el marcaje de proteínas persulfuradas descrito por Mustafa (Mustafa et al., 2009). Este marcaje se da en dos pasos: en el primero se metilan los tioles libres con metil metantiosulfonato (MMTS) y en el segundo se marcan las cisteínas persulfuradas con HPDP-Biotina.

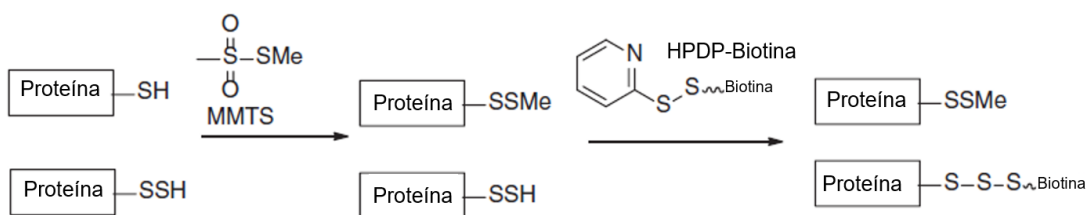


Figura 5. Switch de biotina para S-persulfuración. Los tioles libres se bloquean con MMTS y después se marcan las cisteínas persulfuradas con HPDP-Biotina. MMTS: Metil metanotiosulfonato; HPDP-Biotina: Piridilditiol-biotina.

Se separó la muestra en fracciones de 450 μL , se agregó SDS hasta una concentración final de 2.5 % y se adicionó 20 mM de MMTS para bloquear los grupos tioles libres. Se incubó a 50°C por 20 min a 1400 rpm. En caso de no completar alguna fracción de 450 μL , se agregó amortiguador HEN (receta 6) para completar el volumen. Se pasaron las muestras a tubos de 15 mL, se agregaron 2.5 volúmenes de acetona (-20°C) y se centrifugó a 3100 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar el exceso de MMTS. Fue crítico centrifugar los tubos cuya variación de peso fuera casi nula para evitar perder proteínas, se utilizó una balanza de dos platillos para igualar el peso. Se resuspendió el botón en 1 mL de amortiguador HENS (receta 6) y se centrifugó nuevamente con los mismos cuidados.

Para bloquear las cisteínas persulfuradas, se resuspendió con 800 μL de amortiguador HENS más neocuproina y deferoxamina (receta 8) y se agregaron 200 μL de HPDP-biotina 4 mM en DMSO. Se incubaron las muestras en un agitador por 2 horas a temperatura ambiente en ausencia de luz. Se precipitaron las proteínas con 2.5 volúmenes de acetona al 100 % (-20°C) y se resuspendieron en amortiguador HENS. Se repitió este último paso una vez más y se resuspendió en 200-300 μL de amortiguador HENS (receta 7) según sea la cantidad de muestra obtenida.

Determinación de la concentración mínima del H₂O₂ y del tiempo de exposición que afecte la S-sulfenilación y la S-persulfuración de las proteínas de *S. cerevisiae*

Se preparó un cultivo de *S. cerevisiae* BY4742 en medio YPD a 30°C con agitación constante (250 rpm) hasta alcanzar la fase exponencial (DO_{600nm} 0.5-0.6). El medio de cultivo se dividió en volúmenes iguales, a cada uno de ellos se le adicionó una de las siguientes concentraciones de H₂O₂: 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 mM H₂O₂. Se incubaron por 10 minutos y se procedió con el marcaje de sulfenilación con biotina previamente descrito para analizarlas mediante western-blot.

Después de determinar la concentración de H₂O₂ que ocasione diferencias en el perfil del proteoma sulfenilado se evaluaron los tiempos de exposición de 0, 3 y 10 minutos con la concentración antes escogida y se procedió a marcar con biotina las proteínas y a compararlas por western-blot.

Efecto del H₂O₂ en la S-sulfenilación y la S-persulfuración en las proteínas de *S. cerevisiae* en fase exponencial y en fase estacionaria

Se partió de un cultivo de *S. cerevisiae* BY4742 con una DO_{600nm} de 0.5-0.6, se dividió el total del volumen en dos, una parte se trabajó a esa densidad óptica como células en fase exponencial y la otra mitad se incubaron hasta cumplir las 48 horas, es decir, hasta asegurar la fase estacionaria.

Se dividieron tanto las fracciones de células de fase exponencial como fase estacionaria en alícuotas de 50 mL y se agregaron 0 y 1 mM de H₂O₂ por 10 minutos. Sus proteínas sulfeniladas y persulfuradas se marcaron por el método de switch de biotina y se analizaron por western blot.

Extracción de proteínas para tratamientos *in vitro*

Se cultivó la levadura *S. cerevisiae* BY4742 en 150 mL de caldo YPD a 30°C con agitación constante (250 rpm) por 48 horas. Pasado el tiempo de incubación, se adicionaron 400 mL de medio de cultivo y se incubó por 2 horas más para reactivar el cultivo de células e incrementar el contenido proteico.

Se centrifugó todo el cultivo a 2500 rpm por 5 minutos a 4°C, se lavó con 1 mL de ácido tricloroacético (ATC) al 20 % y se pasó el botón a un nuevo tubo con 500 µL de perlas de vidrio. Se rompieron las células con 10 ciclos de 1 minuto de agitación por vortex y 1 minuto en hielo y se recolectó el sobrenadante en un tubo nuevo. Las perlas se lavaron con 0.5 mL de ACT al 5 % en vortex y se juntó el sobrenadante en el tubo antes mencionado.

Se centrifugó la solución recolectada a 1,400 rpm por 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El ATC se eliminó con 2 lavados de acetona fría (-20°C) y centrifugación a 1,400 rpm por 2 minutos, y esta última se eliminó en speed-vac por 7 minutos o hasta que la muestra tuviera consistencia de polvo.

Sulfenilación *in vitro*

Se cuantificó la proteína extraída por el método del ácido bicinconínico (ABC), se tomaron 3-5 mg de proteína y se resuspendieron en 1 mL de Amortiguador Desnaturalizante (AD; receta 3).

Se agregó 20 mM de DTT a la muestra y se incubó por 30 minutos a 30°C con agitación constante (1,400 rpm). Después se agregó 0.5 mM de H₂O₂ por 5 minutos y se detuvo la reacción con ATC (concentración final del 10 %). Se centrifugó a 1,400 rpm por 10 minutos a 4°C, se realizaron 2 lavados con acetona y se secó la muestra en speed-vac bajo condiciones antes mencionadas. Las muestras recolectadas se marcaron con biotina para su posterior análisis por western-blot. Además, se agregó un control negativo al dar un tratamiento con 20 mM de DTT después del marcaje y de cada tratamiento se realizó una precipitación con perlas de estreptavidina.

Persulfuración *in vitro*

Se tomaron 3-5 mg de proteína extraída por la metodología antes mencionada para proteínas tratadas *in vitro* y se resuspendieron en 1 mL de amortiguador HENS (receta 7). Se agregó 0.5 mM de H₂O₂ a la muestra por 5 minutos con agitación constante (1,400 rpm) a temperatura ambiente. Inmediatamente

después del tiempo de incubación terminara se agregó 1 mM de NaHS recién preparado por otros 5 minutos.

Se precipitaron las proteínas con ATC al 10 % y centrifugación a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se lavó 2 veces con acetona fría y el botón obtenido se resuspendió en 450 µL de amortiguador HENS. Las muestras se marcaron con biotina y se analizaron por western-blot. De igual manera a la sulfenilación *in vitro*, se agregó un control negativo de un tratamiento de 20 mM de DTT después del marcaje y se precipitaron con perlas de estreptavidina.

Cuantificación de proteínas

Se cuantificaron las proteínas según la guía de uso de Thermo Scientific del Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Primero se preparó una curva de calibración de ABS como proteína estándar en concentraciones de 0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 y 2 mg/mL. Después se preparó la solución de trabajo (50:1, A:B) de acuerdo a las instrucciones del kit antes mencionado.

Se colocaron 25 µL de muestra o estándar en un tubo de 1.5 mL más 200 µL de solución de trabajo, se agitó en vortex por 30 segundos e incubó 30 minutos a 37°C en ausencia de luz. Pasado el tiempo, se incubó 1 minuto a 4°C y 5 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 562 nm y se determinó la concentración de las muestras por regresión lineal usando la curva de calibración de ASB (anexo 1)

SDS-PAGE

Se determinó el volumen de muestra equivalente a 10 µg de proteína y se agregó 1:1 de amortiguador de muestra no reductor 2X (receta 13). Se colocaron los geles de poliacrilamida 10 % (receta 16 y 17) en la cámara de electroforesis y se llenó la cámara con amortiguador de corrida 1X. Se cargó en el primer carril del gel el estándar PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder y en los carriles siguientes se agregaron las muestras con el amortiguador de carga. Se separaron las muestras a una corriente de 120 V constante hasta que el frente de corrida saliera del gel. El gel se tiñó con coomassie o se transfirió a una membrana de PVDF para realizar el western blot.

Tinción de Coomassie

Se puso en un recipiente el gel de poliacrilamida con suficiente solución de coomassie que lo cubriera por 10 minutos con agitación constante. Al terminar la incubación, se removió el excedente de coomassie y se adicionó solución para desteñir. Se mantuvo en agitación constante hasta que las bandas fueran observables a simple vista y el fondo fuera claro.

Western blot

Se transfirieron las proteínas del SDS-PAGE a una membrana de PVDF (activada con metanol) en la cámara de Bio-Rad llena de amortiguador de transferencia 1X por 2.5 h a 320 mA. Una vez transferidas las proteínas, se incubó por 1 h a temperatura ambiente con agitación constante en leche descremada Svelty al 5 % cubierta totalmente. Se retiró la leche y se lavó 3 veces por 10 minutos con TBS-T y agitación constante. Después se agregaron anticuerpos según corresponde (tabla 1) y se hicieron 3 lavados con TBS-T entre cada anticuerpo y al final.

Anticuerpo	Marca	Concentración	Tiempo de exposición
α -biotina (sulfenilación)	Sigma-Aldrich	1:300,000	1 hora
α -biotina (persulfuración)	Sigma-Aldrich	1:5,000	Toda la noche
α -Pgk1	Invitrogen	1:5,000	Toda la noche
α -GAPDH	GeneTex	1:5,000	Toda la noche
α -mouse	KPL	1:10,000	1 hora
α -rabbit	Jackson ImmunoResearch	1:20,000	1 hora

Tabla 1: Condiciones de uso de anticuerpos.

Para revelar la membrana, se preparó el sustrato justo antes de empezar la reacción y se prendió el equipo C-DiGit® Blot Scanner de LI-COR. Se colocó

la membrana en una caja negra para aislarla de la luz, se agregó el sustrato (Immobilon ® Western Chemiluminescent HRP Substrate) y se incubó con agitación constante por 1 minuto. Se colocó la membrana en el escáner y se inició la lectura de 6 minutos. Se hizo la interpretación de los resultados en el software Empiria Studio 2.1.

Para revelar las membranas con el anticuerpo anti-biotina se procedió a trabajar en un cuarto oscuro con la ayuda de una lámpara de luz roja. La membrana se incubó igualmente 1 min con el sustrato y se colocó entre dos hojas de acetato, con cuidado de no generar burbujas entre la membrana y la hoja superior. Se posicionó una película sobre la membrana (por encima del acetato) y se cubrió por unos segundos para que la placa captara la señal emitida desde la membrana. La placa se sumergió en solución reveladora hasta que la señal apareciera, luego se limpió con agua y se trató con solución fijadora. Se repitió el proceso con una o más placas hasta obtener un patrón de bandeo definido, se adecuaron los tiempos de exposición para cada inmunoréplica en específico y se evitó la sobresaturación de la señal al reducir los tiempos de exposición o por la sobreposición de dos placas encima de la membrana.

Tinción de Ponceau

Una vez que se transfirieron las proteínas a la membrana de PVDF, esta misma se colocó en un recipiente con rojo de Ponceau por 5 minutos con agitación constante. Se eliminó el excedente de colorante por decantación y cuidadosamente con agua destilada. Una vez que la membrana se secase, se obtuvo una fotografía del resultado.

Determinación de viabilidad celular

Se obtuvo un cultivo de células de *S. cerevisiae* en fase exponencial ($DO_{600nm} = 0.5$) y en fase estacionaria (48 horas). De cada una de ellas se realizó la tinción con azul de tripano para observar la viabilidad celular al ser tratadas con 10 mM de H_2O_2 por 10 minutos. La tinción se realizó mezclando 5 μ L de Azul de Tripano al 0.4 % y 7 μ L de muestra, y se observó en el Microscopio de Fluorescencia OLYMPUS BX-51. Además, se observó la viabilidad de células de levadura

incubadas por 5 minutos a 50 °C para evaluar la eficacia de la técnica de detectar células dañadas.

RESULTADOS

Detección de S-sulfenilación y S-persulfuración *in vitro*

El marcaje de MPTox en residuos de cisteínas se realizó mediante el switch de biotina propuesto por Le Moan para S-sulfenilación y por Mustafa para S-persulfuración.

Para detectar la S-sulfenilación extrajimos las proteínas con ATC, después bloqueamos los tioles reducidos con un agente metilante (iodoacetamida), posteriormente reducimos todos los tioles modificados con S-sulfenilación a tioles libres al agregar un agente reductor (DTT) y por último, los tioles libres que se obtuvieron al reducir con DTT se marcaron con HPDP-Biotina.

Para detectar la S-persulfuración extrajimos las proteínas con amortiguador de lisis HEN con agentes quelantes (deferoxamina, neocuproina y EDTA) e inhibidores de proteasas para proteger tanto las proteínas como la S-persulfuración. Después bloqueamos los tioles libres con MMTS y por último marcamos los persulfuros con HPDP-Biotina.

Para confirmar la especificidad de las técnicas de marcaje empleadas en el proyecto se evaluó la selectividad para detectar una proteína con S-sulfenilación y/o S-persulfuración reportada, así como una proteína carente de cisteínas y por ende incapaz de presentar una MPTox en cisteínas.

En caso de las levaduras, no hay estudios que reporten sulfenilación o persulfuración en alguna de sus proteínas (Wang et al., 2021), sin embargo, una de las proteínas más estudiadas con estas modificaciones postraduccionales es la GAPDH de humano (Fu et al., 2019; Yang et al., 2014) y que tiene un 99 % de similitud con su homóloga de levadura, la cuál conserva dos de las tres cisteínas reportadas como susceptibles a sulfenilación y a persulfuración (figura 6).


```

sp|P00360|G3P1_YEAST      --MIRIANGFGRIGRLVLRRLALQRKIDIEVVAVNDPFISNDYAAVMVKYDSTHGKRYKGTV      58
sp|P04406|G3P_HUMAN      MGKVKVGVNGFGRIGRLVTRAAFNSGKVDIVAINDPFIDLNYMVYMFQYDSTHGKFKHGTV      60
    :.:.:***** * *: .:.*:***** .:*_.*:*****:::***

sp|P00360|G3P1_YEAST      SHDDKHIIIDGVKIATYQERDPANLPWGSGLKIDVAVDSTGVFKELDTAQKHIDAGAKKVV      118
sp|P04406|G3P_HUMAN      KAENGLVINGNPITIFQERDPSKIKWGDAGAEYVVESTGVFTTMEKAGAHLQGGAKRVI      120
    . : . : :*: * * :*****::: ** . : .:*:***** .:.* * :.*****:

sp|P00360|G3P1_YEAST      ITAPSSSAPMFVVGVNHTKYTPDKKIVSNASCTTNCLAPLAKVINDAFGIEEGLMTTVHS      178
sp|P04406|G3P_HUMAN      ISAPSADAPMFVVGVNHEKYDNSLKIISNASCTTNCLAPLAKVIHDNFGIVEGLMTTVHA      180
    *:***;.*****:*** ** . **:*:*****:*****:* *** *****:

sp|P00360|G3P1_YEAST      MTATQKTVDGSPSHKDWRRGGRTASGNIIPSSSTGAAKAVGKVLPELQKLTGMFRVPTVDV      238
sp|P04406|G3P_HUMAN      ITATQKTVDGSPGKLWRDGRGALQNIIPASTGAAKAVGKVIPELNGKLTGMFRVPTANV      240
    ;***** * ** * * *****:*****:***:*****:***:

sp|P00360|G3P1_YEAST      SVVDLIVKLEKEATYDQIKKAVKAAAEQPMKGVLYTEDAVVSSDFLGDTHASIFDASAG      298
sp|P04406|G3P_HUMAN      SVVDLCRLEKPAKYDDIKVVKQASEGPLKGIYTEHQVSSDFNSDTHSSTFDAGAG      300
    *****:*** *_*:***.* * :***:***:*****. ***** .*:** * **_*

sp|P00360|G3P1_YEAST      IQLSPKFVKLISWYDNEYGY SARVVDLIEYVAKA-      332
sp|P04406|G3P_HUMAN      IALNDHFVKLISWYDNEFGYSNRVVDLMAHMASKE      335
    * * .:*****:*** *****: :*.

```

Figura 6. Alineamiento entre GAPDH de *Homo sapiens* (P04406) y GAPDH de *S. cerevisiae* (P00360) por Omega Clustal. En amarillo se identifican las cisteínas con MPTox en *H. sapiens* y las cisteínas conservadas en *S. cerevisiae*.

ID	Position	Modification	FPR	Peptide
sp P00360 G3P1_YEAST	150	S-nitrosilación	0.00 %	KIVSNASC TTN CLAP
sp P00360 G3P1_YEAST	150	S-palmitoilación	0.06 %	KIVSNASC TTN CLAP
sp P00360 G3P1_YEAST	150	S-sulfenilación	1.04 %	KIVSNASC TTN CLAP
sp P00360 G3P1_YEAST	150	S-sulfinilación	0.56 %	KIVSNASC TTN CLAP
sp P00360 G3P1_YEAST	154	S-nitrosilación	0.00 %	NASC TTN CLAPLAKV
sp P00360 G3P1_YEAST	154	S-palmitoilación	0.55 %	NASC TTN CLAPLAKV
sp P00360 G3P1_YEAST	154	S-sulfenilación	0.00 %	NASC TTN CLAPLAKV
sp P00360 G3P1_YEAST	154	S-sulfinilación	0.78 %	NASC TTN CLAPLAKV

Tabla 2. Predicción por pCysMod de MPTox en residuos de cisteína de GAPDH de *S. cerevisiae*.

Además, se usó la herramienta pCysMod para predecir la S-sulfenilación y S-persulfuración de la GAPDH de levadura (UniProtKB ID: P00360). Esta herramienta utiliza la base de datos de iCysMod, la cuál contiene una recopilación de las modificaciones postraduccionales en cisteínas reportadas hasta el momento, y un algoritmo computacional basado en deep learning que evalúa una serie de características en la cisteína que la hace propensa a ser modificada. Las características que considera el programa para predecir a la S-sulfenilación y a la S-persulfuración es la presencia de aminoácidos con carga positiva (arginina y

lisina) en los residuos vecinos a la cisteína, su posición en estructuras secundarias de hélice y en regiones ordenadas (Li et al., 2021).

El resultado de la predicción indicó la posibilidad de que la GAPDH de levadura se modifique por S-sulfenilación (tabla 2) pero no por S-persulfuración (Li et al., 2021), a pesar de que esta modificación si se ha observado en la proteína homóloga de humano (Fu et al., 2019; Yang et al., 2014). Aún así, analizamos la S-sulfenilación y la S-persulfuración de GAPDH *in vitro* en un extracto de proteínas totales de *S. cerevisiae*.

Por el otro lado, se escogió a la chaperona Ccs1 (UniProtKB ID: P40202) como control negativo del marcaje para S-sulfenilación y S-persulfuración por no tener cisteínas en su secuencia de aminoácidos (anexo 5).

Para determinar si GAPDH o Ccs1 se S-persulfuran o S-sulfenilan se marcaron mediante el switch de biotina específico para cada MPTox. Después, se precipitaron las proteínas con perlas de estreptavidina. Estas perlas tienen la cualidad de unirse específicamente con moléculas biotiniladas y se utilizaron para separar a las proteínas marcadas del resto. Para procesar las muestras mediante western-blot, las proteínas se separaron de las perlas con betamercaptoetanol, un agente reductor que reduce el enlace disulfuro entre los tioles de las proteínas y la biotina, lo cual deja a las proteínas sin ninguna marca de biotina. A pesar de que estas proteínas ya no tienen la marca de biotina, si GAPDH o Ccs1 se encuentran en estas muestras significa que en algún momento tuvieron una MPTox, ya sea S-sulfenilación o S-persulfuración.

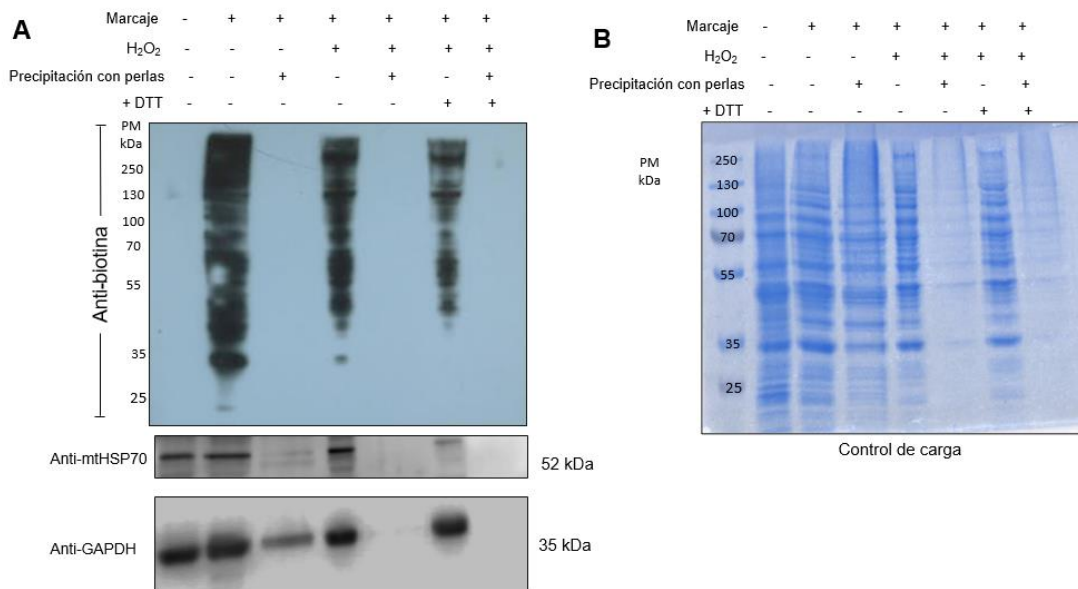


Figura 7. S-sulfenilación *in vitro*. Evaluación del extracto total de proteínas de *S. cerevisiae* ante la presencia (+) o ausencia (-) de las siguientes condiciones: Marcaje: Marcaje de proteínas con switch de biotina para S-sulfenilación; Tratamiento: adición de 0.5 mM H₂O₂ por 5 minutos; Precipitación con perlas: inmunoprecipitación con perlas de estreptavidina de proteínas biotiniladas; +DTT: Eliminación del marcaje del switch de biotina con 20 mM de DTT por 15 minutos. A) Western-blot anti-biotina, anti-mtHSP70 y anti-GAPDH. B) Tinción de Coomassie.

Los resultados en la figura 7 muestran que el anticuerpo anti-biotina prácticamente no detectó proteínas en muestras que no fueron marcadas con el “switch” de biotina para S-sulfenilación, ni tratadas con 0.5 mM de H₂O₂. Por el contrario, se detectaron múltiples proteínas en una muestra marcada con el “switch de biotina”, excepto cuando la muestra se incubó previamente con perlas de estreptavidina, las cuales unen y remueven las proteínas biotiniladas de la solución. En muestras marcadas con biotina y tratadas con H₂O₂ se observan varias proteínas que igualmente son removidas por las perlas de estreptavidina. Finalmente, se observó que adicionar 20 mM de DTT, otro agente reductor, disminuye la señal de las proteínas biotiniladas en las muestras que previamente se trataron con 0.5 mM de H₂O₂ y se marcaron con biotina.

Al utilizar el anticuerpo anti-mtHSP70 (Ccs1), detectamos señal en casi todos los carriles, aún en ausencia de marcaje, menos en las muestras tratadas

con perlas de estreptavidina después de hacer un tratamiento con 0.5 mM de H₂O₂. En los carriles donde se realizó el tratamiento con las perlas de estreptavidina no se detectó a la proteína Ccs1, tal cuál como se esperaba, sin embargo, en el tercer carril se observa mínimamente una banda. Lo anterior se explica por el exceso de proteína que se observa en el coomassie (figura 7B), al tener mucha proteína aumentó la inespecificidad de las perlas e incrementó la presencia de contaminantes.

Con respecto a la detección de GAPDH con el anticuerpo anti-GAPDH se observó señal en todos los carriles menos en la muestra con las siguientes condiciones: tratada con 0.5 mM de H₂O₂, marcada con biotina y reducida con DTT (último carril de la figura 7A). A pesar de que no se observó proteína en esa muestra, si se observó en las demás muestras tratadas con las perlas de estreptavidina. Las perlas de estreptavidina tienen selectividad por las moléculas biotiniladas, por ello es que las utilizamos para concentrar todas las proteínas que se marcaron por el switch de biotina para S-sulfenilación o S-persulfuración, según sea el caso y para excluir aquellas proteínas que no tienen estas MPTox. Lo anterior indica que la GAPDH es una proteína que se sulfenila. Por lo tanto la técnica de marcaje con biotina utilizada permite detectar la S-sulfenilación de proteínas como la GAPDH.

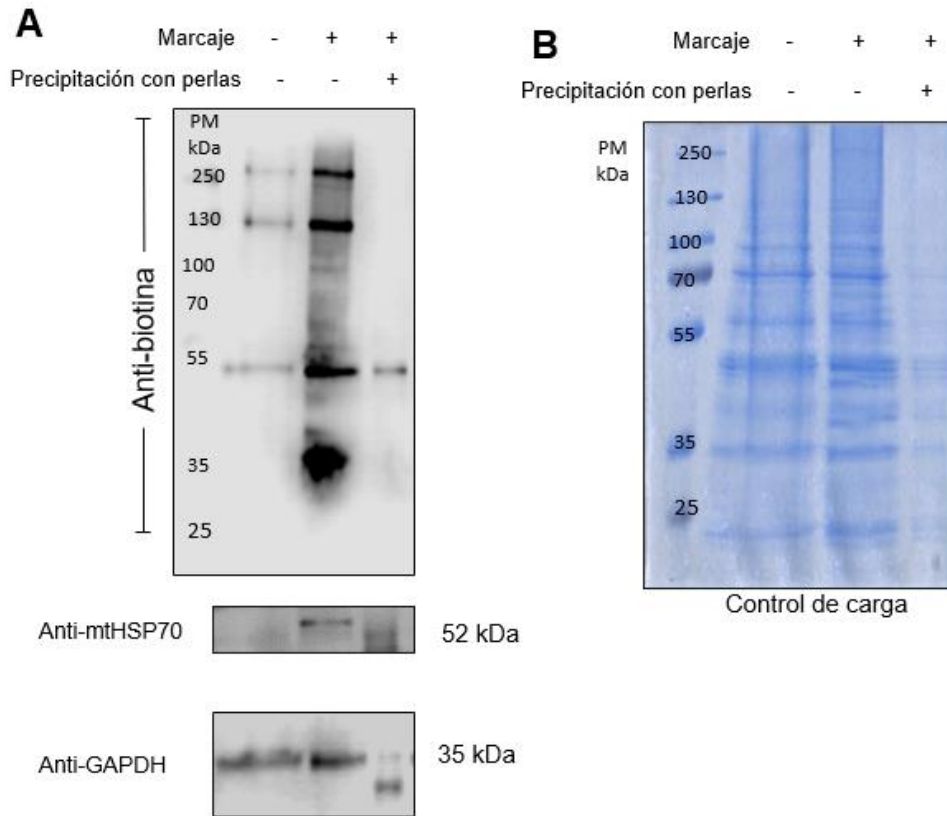


Figura 8. S-persulfuración *in vitro*. Evaluación del extracto total de proteínas de *S. cerevisiae* ante la presencia (+) o ausencia (-) de las siguientes condiciones: Marcaje: marcaje de proteínas con switch de biotina para S-persulfuración; Precipitación con perlas: inmunoprecipitación con perlas de estreptavidina de proteínas biotiniladas A) Western-blot anti-biotina, anti-mtHSP70 y anti-GAPDH. B) Tinción de Coomassie.

En la figura 8 observamos los resultados del marcaje de switch de biotina para S-persulfuración. En el primer carril de la figura 8A se colocó un control negativo de proteínas de *S. cerevisiae* sin marcarse con biotina para detectar toda molécula o proteína biotinilada que pudiera detectar el anticuerpo anti-biotina. En esa muestra encontramos tres bandas que podrían corresponder a proteínas biotiniladas o a inespecificidades del anticuerpo. En el segundo carril, dónde están las proteínas marcadas mediante el switch de biotina se observaron varias bandas que no se observaban en el primer carril, estas son las proteínas que adquirieron la biotina gracias al marcaje antes mencionado en proteínas S-persulfuradas. En el último carril, en la muestra de las proteínas marcadas con

biotina y tratadas con las perlas de estreptavidina encontramos similitud con el primer carril, esto se debe a que el tratamiento con las perlas elimina el enlace disulfuro entre la cisteína de las proteínas y la biotina, dejando a las proteínas sin ninguna marca. La única diferencia entre ambos carriles, el primero y el último, son dos proteínas que desaparecieron después de tratarse con las perlas de estreptavidina, esto podría ser indicativo de que su unión con la biotina es similar a la formada mediante el switch de biotina. Este resultado nos indica que las proteínas adquieren biotina con el método de marcaje de switch de biotina y que esta marca se elimina gracias al tratamiento con perlas de estreptavidina.

Al evaluar la presencia y ausencia de Ccs1 en las distintas muestras con el anticuerpo anti-Ccs1, se observó que en la muestra tratada con perlas de estreptavidina no había Ccs1 a diferencia de la muestra con las proteínas marcadas con biotina y sin tratarse con las perlas. Como las perlas de estreptavidina solo detectan proteínas biotiniladas, esto nos demuestra que Ccs1 no se biotinila y por ende no se persulfura.

En caso contrario, al utilizar el anticuerpo anti-GAPDH encontramos señal de la proteína en todos los carriles, sin excluir la muestra marcada con biotina y tratada con las perlas de estreptavidina. Por lo tanto, esto significa que GAPDH se persulfura.

Evaluación de la viabilidad celular de las células en fase exponencial y fase estacionaria al exponerse al H₂O₂

Después de analizar la efectividad de las técnicas de marcaje por switch de biotina se procedió a evaluar el efecto que induce el peróxido de hidrógeno en la viabilidad celular de *S. cerevisiae* por medio de una tinción con Azul de Tripano.

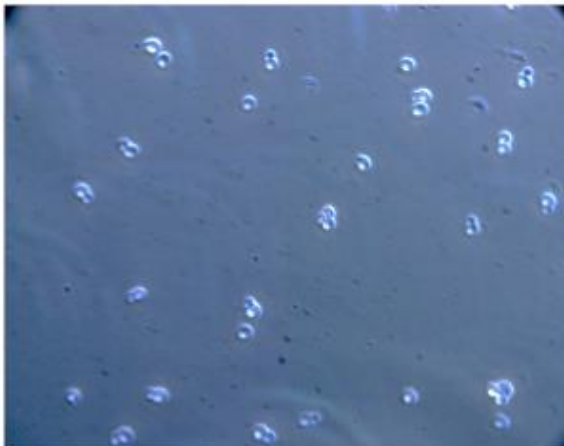
El objetivo de este ensayo era descartar que las condiciones experimentales que se emplearían en ensayos posteriores dañaron íntegramente a la célula y así nuestros resultados representarían aproximadamente la actividad basal de *S. cerevisiae*.

El principio de la tinción con Azul de Tripano se basa en que la membrana celular de una célula viable excluye al colorante. Una vez dentro, el Azul de

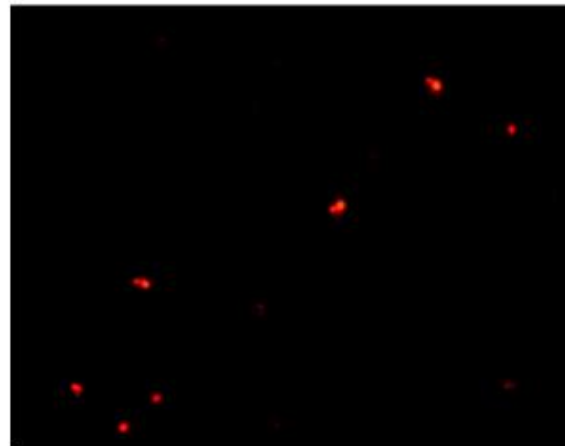
Tripano se une a las proteínas de la célula y puede ser visualizado por microscopía de fluorescencia (Strober, 2015).

Para asegurar la eficacia de la técnica en detectar la viabilidad de las células se observaron bajo el microscopio de fluorescencia Olympus BX-51 un control positivo y uno negativo. El control positivo consistía en inducir un choque térmico (50°C por 5 minutos) a un cultivo de *S. cerevisiae* en fase exponencial, al afectar su integridad podemos observar en la figura 9 que capta al colorante fluorescente y se llenan completamente de él. Por el otro lado, el control negativo era el mismo medio de cultivo sin ser tratado con calor y se puede observar en la figura 9 que mantienen su capacidad de excluir al colorante al observarse solamente en la periferia de la célula.

Control Positivo



Campo claro

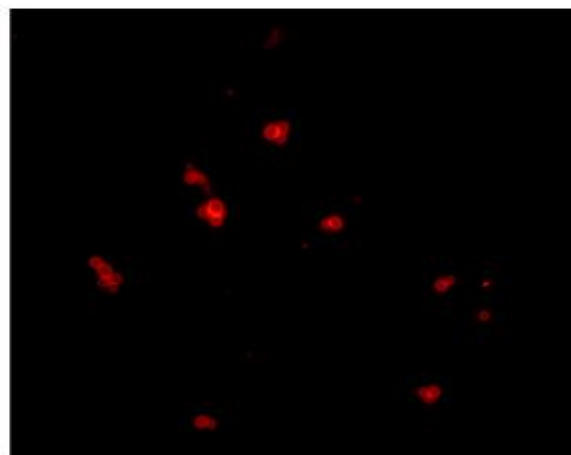


Fluorescencia

Control negativo



Campo claro



Fluorescencia

Figura 9: Eficacia de la tinción con Azul de Tripano. Comparación de la viabilidad celular con Azul de Tripano de células de *S. cerevisiae* en fase exponencial incubadas a 50°C por 5 minutos (control positivo) y células sin ningún tratamiento (control negativo).

Posteriormente se procedió a evaluar bajo esta tinción las células en fase exponencial y en fase estacionaria tratadas con 10 mM de H₂O₂ por 10 minutos. Estas condiciones experimentales representan al límite superior de las concentraciones de H₂O₂ y tiempos de exposición propuestos en el presente proyecto.

Tanto en la figura 10 como la 11 se observó que aún al tratar con 10 mM H_2O_2 por 10 min no aumenta la cantidad de células que capten al colorante. Con lo anterior demostramos que las células tanto en fase exponencial como en fase estacionaria pueden resistir este tratamiento sin afectar notablemente su viabilidad celular.

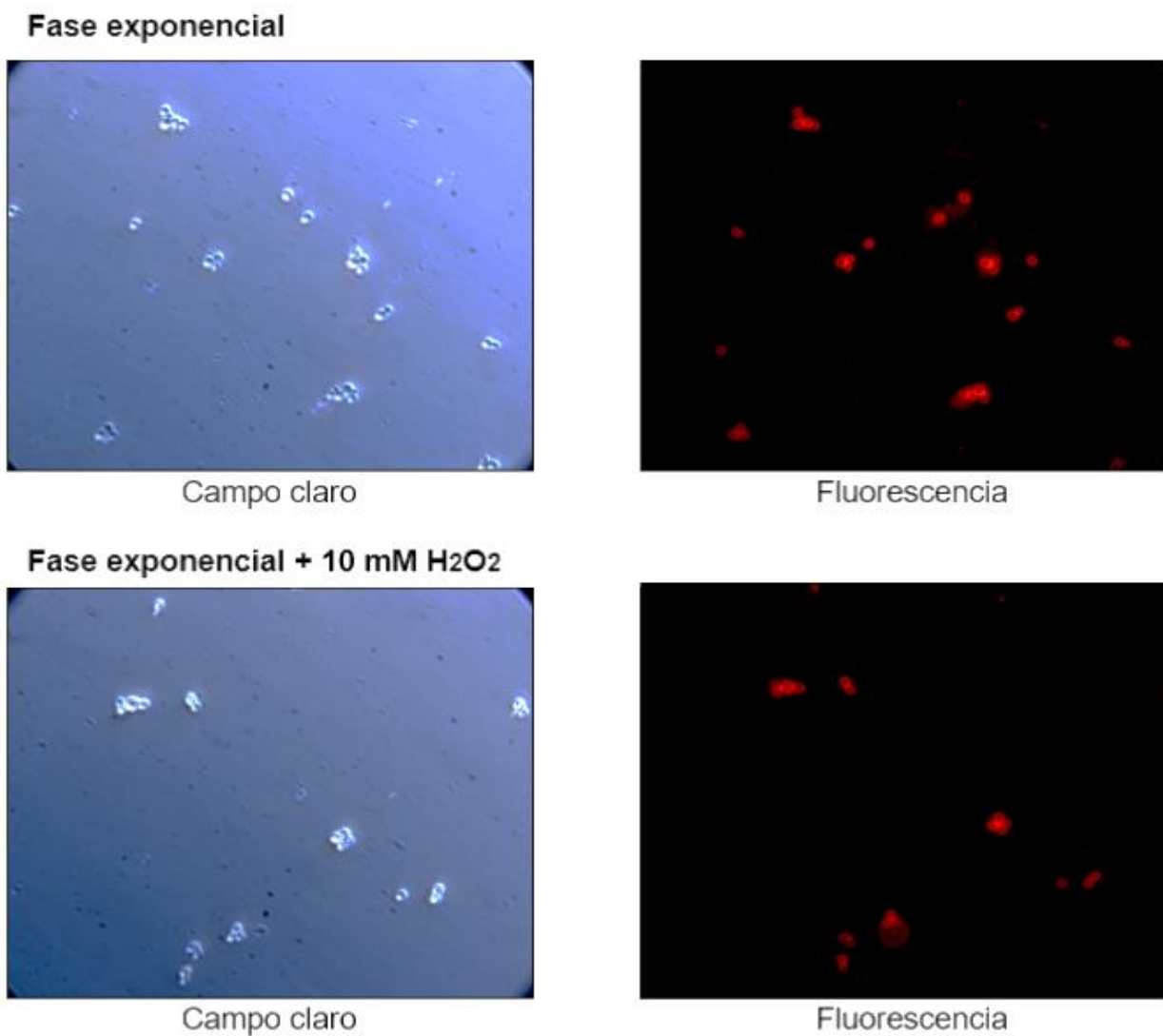
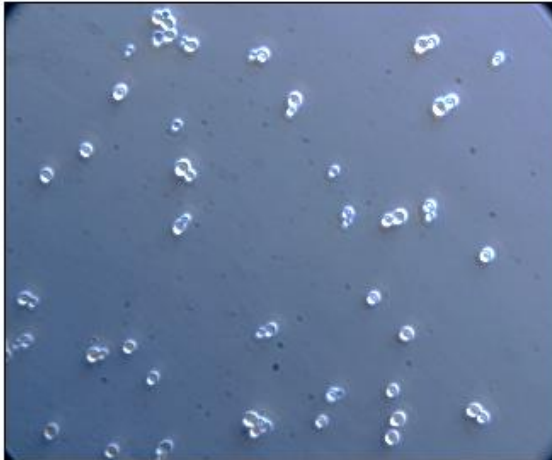
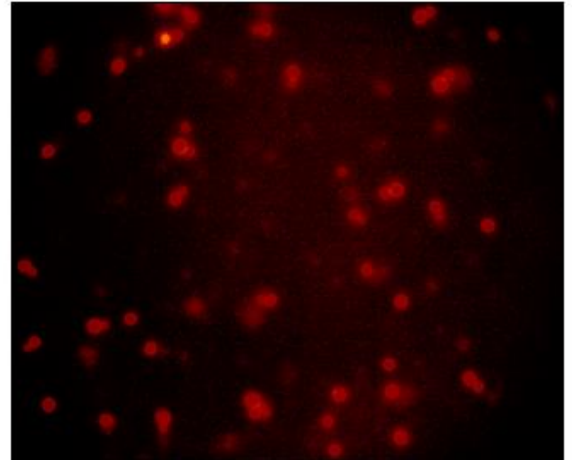


Figura 10. Evaluación de la viabilidad celular con Azul de Tripano de células de *S. cerevisiae* en fase exponencial en ausencia y presencia de 10 mM de H_2O_2 por 10 minutos.

Fase estacionaria

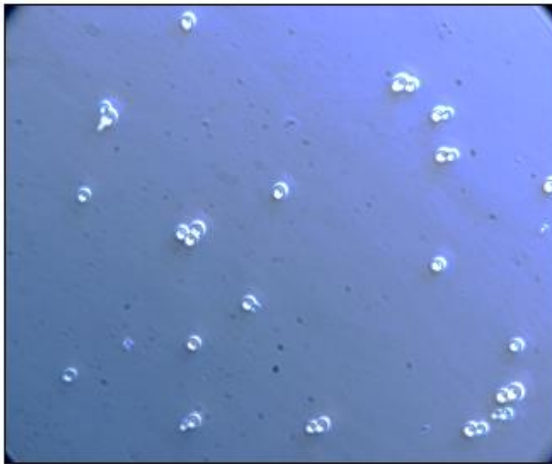


Campo claro

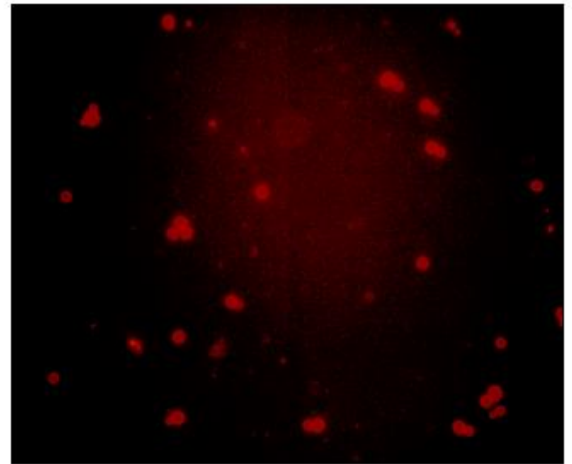


Fluorescencia

Fase estacionaria + 10 mM H₂O₂



Campo claro



Fluorescencia

Figura 11. Evaluación de la viabilidad celular con Azul de Tripiano de células de *S. cerevisiae* en fase estacionaria en ausencia y presencia de 10 mM de H₂O₂ por 10 minutos.

Efecto del peróxido de hidrógeno en la S-sulfenilación y la S-persulfuración del proteoma de *S. cerevisiae* BY4742

Se evaluó el perfil de proteínas sulfeniladas a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, de 0 a 10 mM H₂O₂, concentraciones a las cuales en exposiciones prolongadas la muerte celular llega hasta un 80 % (Madeo et al., 1999).

En la figura 12 observamos las proteínas sulfeniladas marcadas con biotina a concentraciones de 0, 2.5, 5, 7.5 y 10 mM de H₂O₂. En el primer carril (0 mM de H₂O₂) se demostró que en la célula hay proteínas sulfeniladas sin la necesidad de adicionar H₂O₂ al medio de cultivo. Esta señal de proteínas sulfeniladas cambió al adicionar H₂O₂, encontramos diferencias en la intensidad de la banda de proteínas de al menos 9 grupos que comparten un peso molecular similar que podemos ver señaladas en la figura 12 con una flecha. Se demostró que dependiendo de la concentración de H₂O₂ adicionada el patrón de bandas cambió, sin embargo, el efecto difirió en proteínas de diferentes pesos moleculares. Se observó que en las bandas de las proteínas con un peso molecular menor a los 55 kDa disminuyó su intensidad conforme aumentaba la concentración del peróxido de hidrógeno, una de las proteínas que representan este efecto es la señalada por la flecha localizada encima del marcador de peso molecular de 15 kDa en la figura 12A. Por otro lado, las bandas de más de 55 kDa de peso molecular aumentaron la intensidad de sus bandas, en este grupo sobresalen las proteínas señaladas por la flecha aproximadamente a 70 kDa de peso molecular

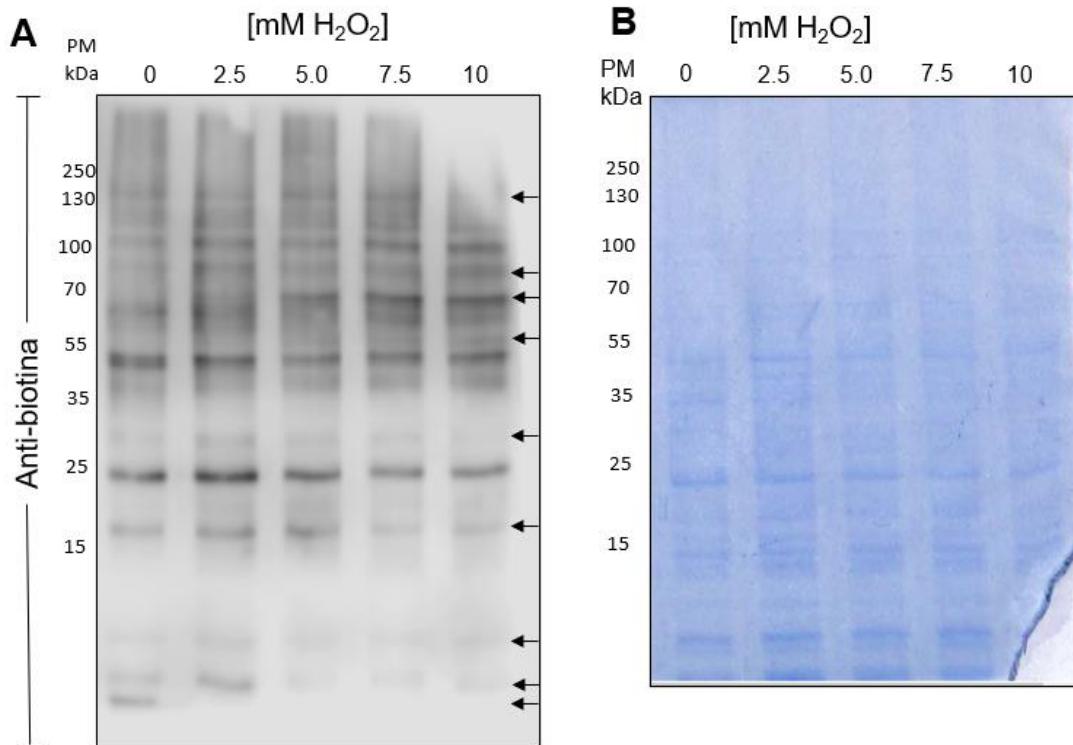


Figura 12. Efecto en la S-sulfenilación del tratamiento con 0, 2.5, 5, 7.5 y 10 mM de H₂O₂. Western-blot anti-biotina del marcaje para S-sulfenilación por switch de biotina de células en fase exponencial expuestas a diferentes concentraciones de H₂O₂. A: Western-blot anti-biotina. Flechas: Bandas con diferencias en comparación al grupo sin tratamiento. B: Tinción de coomassie.

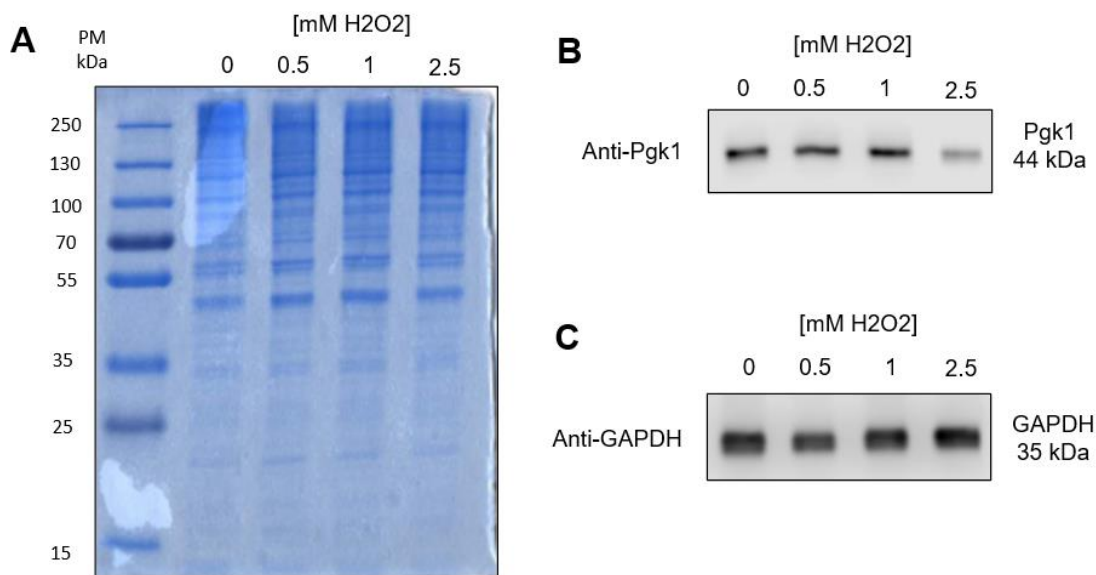


Figura 13. Efecto de 0-2.5 mM de H₂O₂ en Pgk1 y GAPDH. Adición de 0, 0.5, 1 y 2.5 mM de H₂O₂ por 10 minutos a un cultivo de *S. cerevisiae* en fase exponencial. A) Tinción de Coomassie. B) Western-blot anti-Pgk1 C) Western-blot anti-Pgk1.

Para corroborar que los cambios en la intensidad de las bandas se relacionan a la cantidad de MPTox y no a la cantidad de proteína se evaluó la integridad de dos proteínas que son utilizadas como control de carga en experimentos con tratamientos de hasta 1 mM de H₂O₂: Pgk1 (Topf et al., 2018) y GAPDH (Peralta et al., 2015; Zhang et al., 2014). Tal cual se observa en la figura 13, encontramos que la cantidad de Pgk1 detectada por el anticuerpo anti-Pgk1 disminuye al tratar las células con 2.5 mM de H₂O₂. Por el otro lado, GAPDH no se vio afectada por ninguna de estas concentraciones de H₂O₂.

La disminución drástica de la S-sulfenilación en proteínas con peso molecular menor a 55 kDa, tal cual pasó con Pgk1, plantearon una serie de interrogantes: ¿disminuye la señal de S-sulfenilación a causa de una sobre-oxidación y/o degradación? ¿el nivel de oxidación les hace propensas a formar puentes disulfuro, agregados u otros complejos que eliminan el ácido sulfénico de sus grupos tioles? Sin embargo, son preguntas que se alejan de los objetivos del presente proyecto, pero que podrían ser investigadas en un futuro.

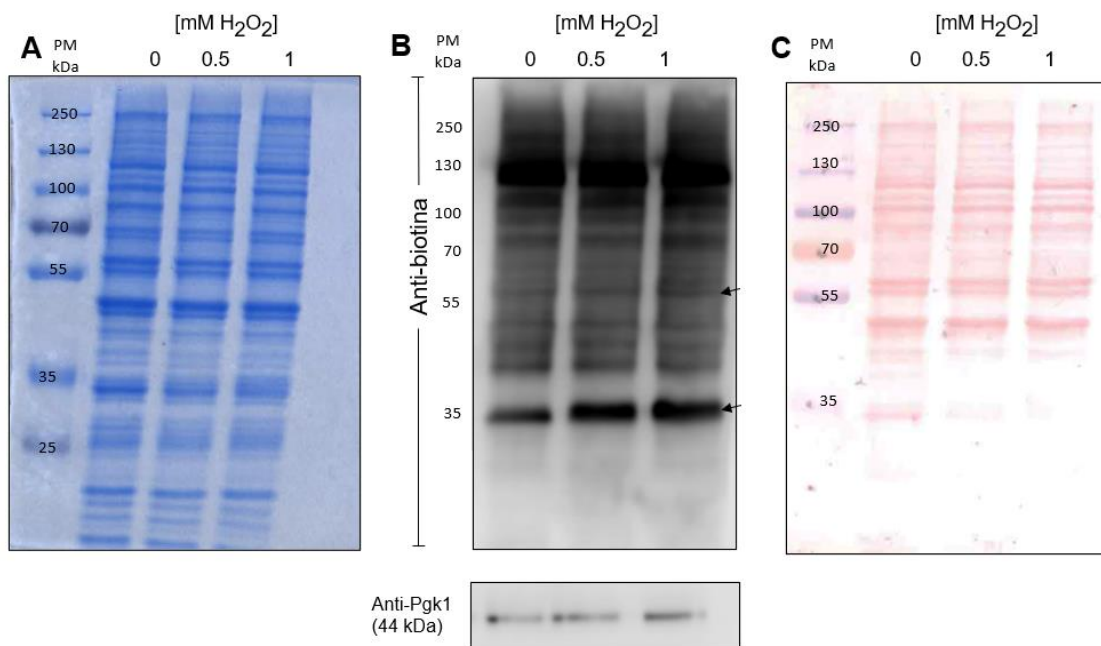


Figura 14. S-sulfenilación a diferentes concentraciones de H₂O₂ (0, 0.5 y 1 mM). Western-blot anti-biotina del marcaje para S-sulfenilación por switch de biotina de células en fase exponencial expuestas a diferentes concentraciones de H₂O₂. A) Tinción de Coomassie. B) Western-blot anti-biotina y anti-Pgk1. C) Tinción de Ponceau. Flechas: Bandas con diferencias al grupo control (0 mM H₂O₂).

Como el objetivo de este proyecto era buscar la concentración mínima de H₂O₂ que demostrara una diferencia evidente con el perfil de proteínas modificadas basalmente y así descartar cualquier otro efecto que no fuera la oxidación directa con el agente estresor, se evaluó el efecto de concentraciones menores: 0, 0.5 y 1 mM H₂O₂. Además, para obtener una mejor resolución en las bandas con un peso molecular mayor a 35 kDa se eluyeron las proteínas hasta que el indicador del marcador de peso molecular de 15 kDa saliera del gel.

En la figura 14 se encuentra la evaluación de la inmunoréplica de biotina usando el anticuerpo anti-biotina de muestras tratadas con 0, 0.5 y 1 mM de H₂O₂. En los carriles de las muestras tratadas con 0.5 y 1 mM de H₂O₂ se observó que la señal de la sulfenilación en al menos 2 grupos de proteínas aumenta, proteínas con alrededor de 35 y 55 kDa de peso molecular (mayor información en anexo 3). De entre ambas concentraciones (0.5 y 1 mM H₂O₂) se eligió 1 mM H₂O₂

gracias a que las diferencias eran perceptibles a simple vista y que resalta una banda alrededor de los 55 kDa que no es detectable a 0.5 mM H₂O₂.

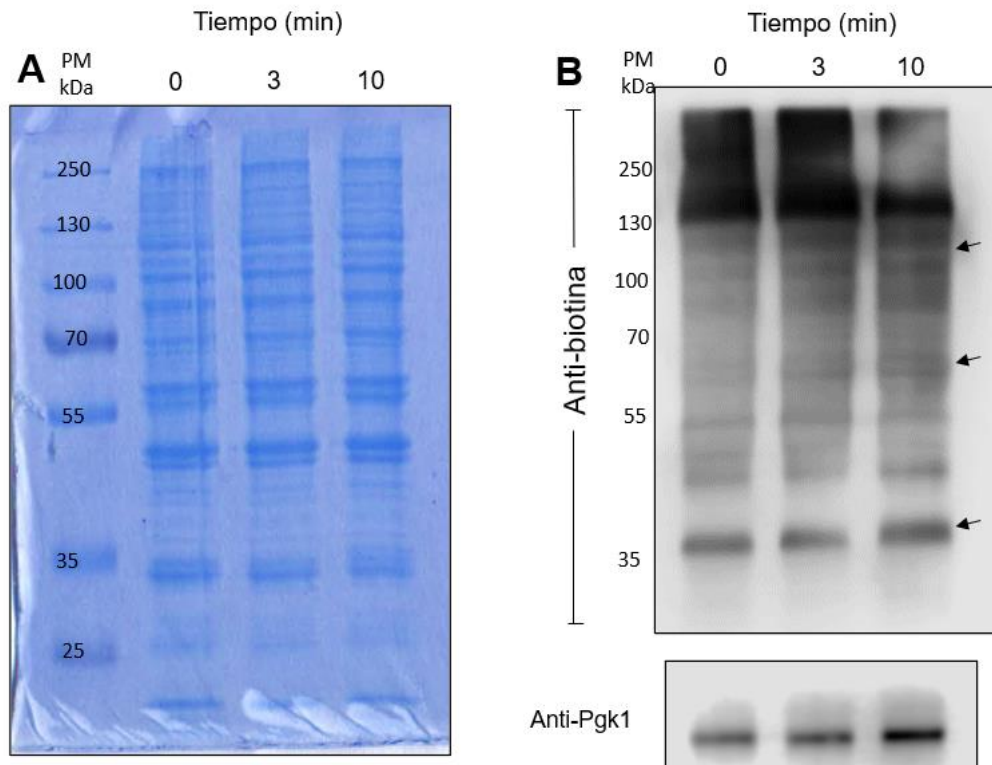


Figura 15. S-sulfenilación generada por diferentes tiempos de exposición a 1 mM H₂O₂. Western-blot anti-biotina de proteínas marcadas por switch de biotina para S-sulfenilación expuestas a 1 mM H₂O₂ por 0, 3 y 10 min. A) Tinción de Coomassie. B) Western-blot anti-biotina y anti-Pgk1. Flechas: Bandas con diferencias al grupo control (0 mM H₂O₂).

Además de la concentración, también se determinó el menor tiempo de exposición al cuál aparecen las diferencias con el proteoma S-sulfenilado sin tratamiento. Se trabajó a 0, 3 y 10 minutos de exposición. En la figura 12 observamos el western-blot anti-biotina bajo estas condiciones. Aunque encontramos diferencias al adicionar H₂O₂ en los primeros 3 minutos de exposición, no fue hasta los 10 minutos donde el cambio era evidente como se puede observar en la banda señalada aproximadamente a 55 kDa (más información en el anexo 3).

En base a los resultados anteriores se seleccionó el tratamiento de 1 mM de H₂O₂ por 10 minutos como el menor tiempo y menor concentración que permite observar un cambio evidente en la S-sulfenilación de las proteínas.

Asimismo, se corroboró que en el perfil persulfurado se encontraban diferencias (figura 18) al observar mayor intensidad de manera generalizada en las bandas del tratamiento en comparación al grupo control.

Diferencias en las proteínas sulfeniladas y persulfuradas de *S. cerevisiae* BY4742 entre la fase exponencial y la fase estacionaria

Evaluamos si se correlaciona la fase metabólica del cultivo con la cantidad o con los tipos de proteínas que se modifican.

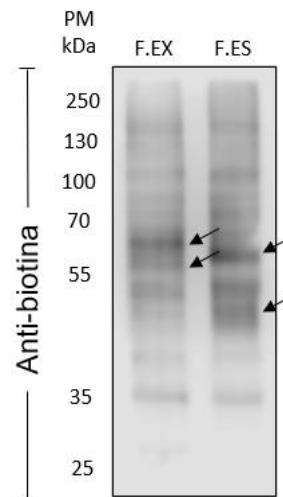


Figura 16. Diferencias entre la S-sulfenilación de células en fase exponencial y fase estacionaria. Western-blot anti-biotina de proteínas marcadas por switch de biotina para S-sulfenilación. F.EX: Fase exponencial, F.ES: Fase estacionaria. Flechas: Bandas diferentes entre ambas condiciones, PM: Peso molecular.

Se marcaron por el switch de biotina a las proteínas S-sulfeniladas provenientes de un cultivo en fase exponencial y se compararon con la fase estacionaria. En la figura 16 observamos las proteínas de ambas fases metabólicas marcadas con biotina. En el perfil de proteínas sulfeniladas detectadas por el anticuerpo anti-biotina se encontró que las células en fase exponencial presentan dos grupos de proteínas modificadas que no se encuentran en la fase estacionaria, y de igual manera hay dos grupos en la fase estacionaria que no se presentan en la fase exponencial (figura 16 y 17).

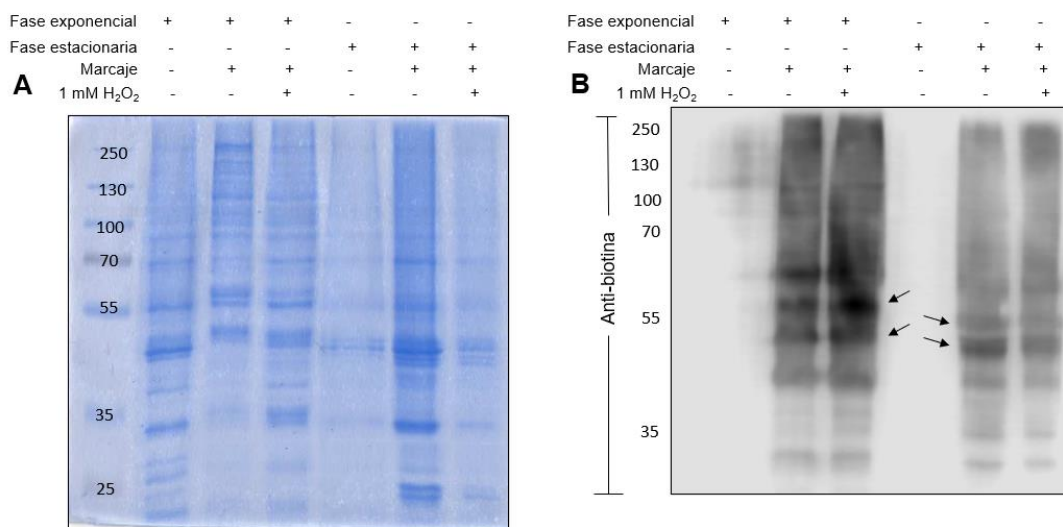


Figura 17. Comparación de la S-sulfenilación de *S. cerevisiae* en fase exponencial y fase estacionaria con 1 mM de H₂O₂. A) Tinción de Coomassie. B) Western-blot anti-biotina. Marcaje: marcaje por switch de biotina para S-sulfenilación; 1 mM H₂O₂: adición de 1 mM H₂O₂ por 10 minutos; Flecha: banda presente solamente en células en fase estacionaria.

Ambas fases se caracterizan por encontrarse en estados metabólicos diferentes, en la fase exponencial tenemos nutrientes suficientes para mantener el crecimiento celular y producción de energía a base de la fermentación de los azúcares, mientras que en la fase estacionaria las células sufren de un proceso de inanición y se enfoca principalmente en la respiración aeróbica (Werner-Washburne & Singer, 1993). Estas diferencias impactan en los niveles de transcripción y traducción de diferentes proteínas, por lo cuál es comprensible que proteínas que se modifican durante la fase exponencial no sean perceptibles en la fase estacionaria y viceversa.

Al comparar ambas fases metabólicas con respecto a su perfil de proteínas persulfuradas como podemos ver en la figura 18 observamos un grupo de proteínas aproximadamente a 55 kDa que solo se encuentra en las proteínas de la fase estacionaria. Esto nos indica que hay al menos un grupo de proteínas que se persulfuran solamente en la fase estacionaria.

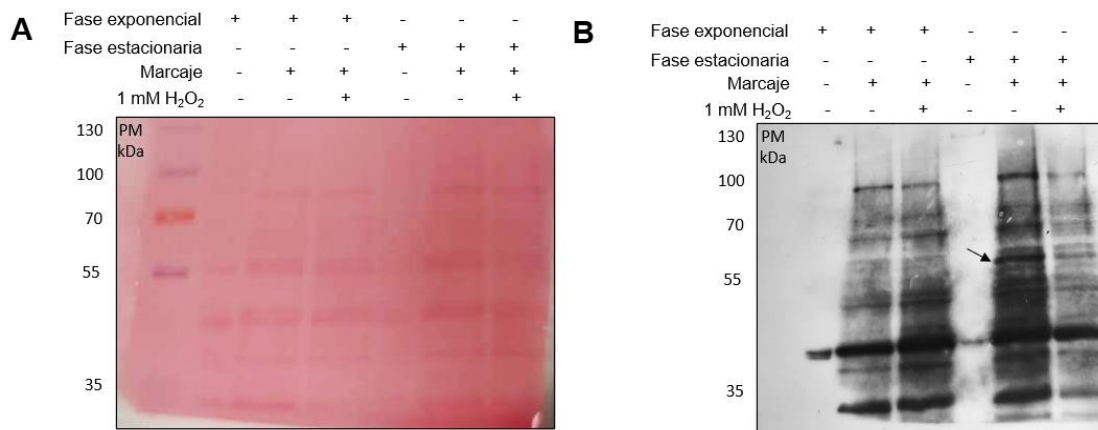


Figura 18. Comparación de la S-persulfuración de *S. cerevisiae* en fase exponencial y fase estacionaria con 1 mM de H₂O₂. A) Tinción de Ponceau. B) Inmunoréplica tipo Western-blot usando un anticuerpo anti-biotina. Marcaje: marcaje por switch de biotina para S-persulfuración; 1 mM H₂O₂: adición de 1 mM H₂O₂ por 10 minutos; Flecha: banda más abundante en las células de fase estacionaria.

De la figura 18 también encontramos que la S-persulfuración de *S. cerevisiae* en ambas fases metabólicas (fase exponencial y fase estacionaria) al tratar con 1 mM H₂O₂ por 10 minutos presentan diferentes comportamientos. En la fase exponencial hay un incremento de la señal, mientras que en la fase estacionaria hay una disminución.

DISCUSIÓN

Desde el descubrimiento del efecto de agentes oxidantes como el H_2O_2 en el metabolismo celular en la década de los setenta (Sies, 2017) se ha replanteado la actividad de estas moléculas, desde de ser moléculas tóxicas gracias a su capacidad oxidante a ser mensajeros cuya finalidad es transmitir la señal generada por estímulos que podrían romper la integridad de la célula e inducir mecanismos de respuesta al estrés (Stone & Yang, 2006).

La vía por la cual se transmite la señal del agente oxidante a través de las proteínas es por medio de la formación de modificaciones postraduccionales en residuos de cisteínas. Estas modificaciones dependen de la concentración de los agentes oxidantes, del tipo de especie oxidante y de la proteína blanco, por lo cual las MPTox indican que la señalización es un proceso controlado que permite una respuesta adecuada con respecto al ambiente al que se encuentre la célula (Alcock et al., 2018).

Se conocen las proteínas que se modifican por S-sulfenilación en *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Bos Taurus*, *Sus scrofa* y *Arabidopsis thaliana*, y por S-persulfuración en *Homo sapiens* y *Arabidopsis thaliana*. Hasta el momento hay reportadas entre todos los organismos 1,577 proteínas que se sulfenilan y 1,343 proteínas que se persulfuran. Sin embargo, no se han investigado estas MPTox en las proteínas de *Saccharomyces cerevisiae*. Ambas modificaciones postraduccionales se encuentran principalmente en las rutas de la biogénesis de los ribosomas y en el inicio de la traducción de proteínas, aunque también están presentes en otras proteínas como lo son los constituyentes estructurales del citoesqueleto, helicasas, procesos metabólicos del ARNr, en el espliceosoma, por mencionar algunos ejemplos (Li et al., 2021; Wang et al., 2021). Se esperaría que las proteínas de estos procesos metabólicos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* también se modifiquen por S-sulfenilación y/o S-persulfuración.

La reacción que genera estas modificaciones puede alcanzar constantes de velocidad de hasta $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en proteínas como la peroxirredoxina Prx2

de *H. sapiens* y 2.2×10^7 en Tsa1 de *S. cerevisiae*, por lo que es cuestión de segundos para que sea visible la respuesta de la célula ante el estímulo por oxidación (Gupta & Carroll, 2014).

Las concentraciones empleadas en el presente estudio en exposiciones prolongadas representan un daño oxidativo severo en las levaduras la cual genera la fragmentación del ADN en entre el 20-40 % de las células del cultivo en tratamientos prolongados (Madeo et al., 1999). En células del humano, esta concentración desencadenaría procesos inflamatorios y muerte celular (Sies & Jones, 2020). Por este motivo, se evaluó y se determinó que trabajar con tiempos relativamente cortos (10 minutos) no comprometían la viabilidad de las células, tal cual podemos observar en los resultados al teñir las células con Azul de Tripano después de ser sometidas a 10 mM de H_2O_2 por 10 minutos (figuras 10 y 11).

Los resultados obtenidos al evaluar el perfil de proteínas S-sulfeniladas a concentraciones iguales o superiores a 2.5 mM H_2O_2 indican que hay una disminución en esta MPTox en proteínas de bajo peso molecular. Esto se debe a que la S-sulfenilación es un grado de oxidación inicial, pero cuando las levaduras obtienen concentraciones de H_2O_2 elevadas sus proteínas sufren de MPTox como S-sulfonilación o S-sulfonilación que no son detectadas por el switch de biotina para S-sulfenilación. Como estas MPTox solo se observan en estrés oxidativo severo, no son de interés para los fines de este proyecto cuyo objetivo es analizar la dinámica de las MPTox en un ambiente que represente a la actividad cercana a la basal de la célula.

De igual manera, otro fenómeno que podría ocurrir con estas proteínas que impida su detección con anticuerpos anti-biotina es la agregación proteica. Se ha demostrado que las proteínas se agregan gracias a la formación de puentes disulfuro en consecuencia al estrés oxidativo (Lévy et al., 2019), así como también pueden formar complejos dependientes de la oxidación de cisteínas (Ford et al., 2019; Mitchell et al., 2018).

Lo anteriormente expuesto nos llevó a tratar a las células con menores concentraciones de H_2O_2 y se identificó que con 1 mM H_2O_2 hay cambios en el

marcaje de S-sulfenilación. Se evaluó el tiempo que necesitaban las proteínas para obtener la MPTox y se observó que a los primeros 3 minutos de exposición a 1 mM de H₂O₂ (figura 15) ya había diferencias, sin embargo, fue hasta los 10 minutos donde se observaba con mayor claridad el contraste entre las proteínas S-sulfeniladas provenientes de células con y sin la adición de 1 mM H₂O₂. Por estos motivos se decidió tratar a las células con 1 mM H₂O₂ por 10 minutos en los ensayos posteriores.

Gracias al marcaje de switch de biotina para S-sulfenilación y S-persulfuración se confirmó que en la levadura también se encuentran presentes estas MPTox en residuos de cisteínas, tal cual se da en organismos multicelulares complejos como el ser humano y que se presenta en condiciones que no comprometen la integridad de la célula. Podría considerarse la posibilidad de conservar también los mecanismos de regulación por oxidación de residuos de cisteína presentados en otros organismos (Hildebrandt et al., 2015; Marino et al., 2010; Roger et al., 2020), para ello es necesario hacer un estudio de identificación de las proteínas modificadas y evaluar el efecto que ejerce la MPTox en ellas.

Por otro lado, se tenía reportado que en células de mamífero los niveles de S-persulfuración aumentan en respuesta a un estresor oxidativo como el peróxido de hidrógeno, de manera similar a la S-sulfenilación (figura 19). Al tratar las células de levadura con 1 mM de H₂O₂ confirmamos que este fenómeno está conservado en este organismo (figura 18). Sin embargo, el mecanismo para la formación de la S-persulfuración en respuesta al peróxido de hidrógeno es desconocido hasta el momento y no se había estudiado este efecto en las levaduras, pues en mamíferos se hipotetiza que este efecto está mediado por los receptores de factor de crecimiento epidérmico, los cuales no se encuentran presentes en *S. cerevisiae* (Zivanovic et al., 2019). Además, tampoco se ha estudiado en la levadura la hipótesis de que el aumento de H₂S y de S-persulfuración está mediado por la S-sulfenilación de CSE, proteína homóloga a Cys4 de levadura (Huang et al., 2017; Wang et al., 2021).

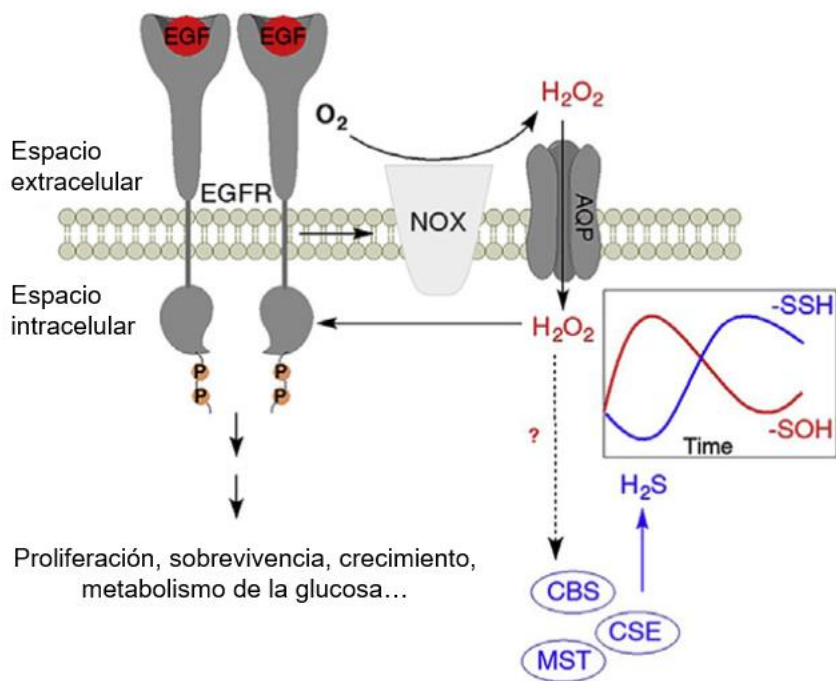


Figura 19. Efecto del H_2O_2 en la síntesis de la S-persulfuración en mamíferos. Esquema que detalla la síntesis de H_2O_2 , PSOH, H_2S y de PSSH por la activación del receptor del factor de crecimiento epidermal. EGFR: receptor del factor de crecimiento epidermal, EGF: factor de crecimiento epidermal, NOX: NADPH oxidasa, AQP: acuaporina (Zivanovic et al., 2019).

Para sustentar la idea de que la levadura también adquiere MPTox, se trabajó con la identificación de S-sulfenilación y S-persulfuración en GAPDH de la levadura. Primeramente, el alineamiento entre la GAPDH de levadura y la del *H. sapiens* evidenció un 99 % de similitud, así como la conservación de las cisteínas que tienen MPTox en *H. sapiens* (Cys152 y Cys156 en *H. sapiens*, Cys150 y Cys154 en *S. cerevisiae*; anexo 5) y que también se predice por medio de la herramienta pCysMod que la GAPDH de levadura puede sufrir PSOH (anexo 6). Además, fue necesario hacer la evaluación experimental. Al hacer precipitados con perlas de estreptavidina pudimos separar del lisado total a las proteínas que se marcaron con biotina por tener PSOH o PSSH en alguna de sus cisteínas. En estos precipitados encontramos a la GAPDH al utilizar un anticuerpo específico para ella y así confirmar que también sufre de ambas MPTox.

Anteriormente ya se había evaluado la susceptibilidad de residuos de cisteína de superficie a ser modificados por oxidación en la levadura (Marino et al., 2010), pero no se había especificado que MPTox obtenían. Al utilizar los métodos de marcaje específicos para S-sulfenilación y S-persulfuración se obtuvo el primer acercamiento del comportamiento de estas modificaciones postraduccionales en el proteoma de la levadura ante diferentes condiciones: tiempo de exposición, concentración al estresor y fases metabólicas. Los cambios del perfil de bandas, nos permite identificar las condiciones que presentan diferencias evidentes y que en futuros proyectos podrían utilizarse para identificar las proteínas susceptibles a la S-sulfenilación y/o S-persulfuración. La susceptibilidad de las proteínas a modificarse varía de cisteína a cisteína, depende de su posición en estructuras secundarias (la S-sulfenilación y la S-persulfuración predominan en hélices), si la región es ordenada o desordenada (la PSOH y la PSSH predominan en regiones ordenadas) y de los aminoácidos que rodean a las cisteínas (la lisina predomina en la posición +1 con respecto a la cisteína en la PSOH y la PSSH) (Li et al., 2021).

Con la comparación del patrón de proteínas modificadas entre la fase exponencial y la fase estacionaria nos mostró diferencias notables en las proteínas que tienen una MPTox entre las dos fases, por lo cual estudiarlas nos dará una mejor cobertura de proteínas con S-sulfenilación y/o S-persulfuración. Estos cambios se sustentan principalmente por las diferencias metabólicas de ambas fases. Por ejemplo, las células en fase exponencial se enfocan en la transcripción y traducción de proteínas de la fermentación para producir su energía, en cambio, las células en fase estacionaria priorizan la respiración celular con el mismo fin (Werner-Washburne & Singer, 1993).

Además de las diferencias metabólicas que hay en cada una de las fases, también difieren en morfología y expresión de genes de respuesta al estrés oxidativo que les confiere una mayor resistencia al H₂O₂ (Folch-Mallol et al., 2004; Sousa-Lopes et al., 2004; Werner-Washburne & Singer, 1993), gracias a que incrementan los niveles de proteínas antioxidantes por no haber una inhibición mediada por rutas que propician al crecimiento célula, como la vía Ra-cAMP-PKA

(Roger et al., 2020; Zakrajšek et al., 2011). Observamos que tanto la S-sulfenilación como la S-persulfuración disminuyen cuando agregamos H_2O_2 en fase estacionaria, a comparación del comportamiento en fase exponencial donde ambas señales aumentan. Este efecto se explica por la elevada resistencia al estrés oxidativo que tienen las células en fase estacionaria, sin embargo, aunque la literatura avala esta hipótesis, es necesario confirmar experimentalmente que la disminución de la S-sulfenilación y la S-persulfuración en fase estacionaria al adicionar 1 mM de H_2O_2 no se deba a una sobre-oxidación de proteínas que desencadenara MPTox como S-sulfinilación y S-sulfonilación.

CONCLUSIONES

La S-sulfenilación y la S-persulfuración son modificaciones postraduccionales en residuos de cisteínas dinámicas que se ven afectadas en los primeros minutos de exposición a agentes oxidantes como el H_2O_2 , sin comprometer la viabilidad celular de la levadura *S. cerevisiae*.

Al igual que en células de mamífero, la adición de H_2O_2 en el ambiente extracelular aumenta los niveles de S-persulfuración en *S. cerevisiae* en fase exponencial.

Hay diferencias en la S-sulfenilación y la S-persulfuración de las proteínas de *S. cerevisiae* entre la fase exponencial y la fase estacionaria.

PERSPECTIVAS

Las muestras obtenidas en este trabajo se analizarán por cromatografía de líquidos acoplada a masas (LC-MS/MS) para determinar por peso y carga la identidad de las proteínas de la levadura *S. cerevisiae* que pueden tener una S-sulfenilación y/o S-persulfuración. Cada una de estas proteínas propondrán las bases para nuevos proyectos cuya finalidad será identificar los procesos regulatorios de estas modificaciones y la implicación que tiene la oxidación de cisteínas en la actividad del metabolismo.

De igual manera, será necesario en proyectos futuros investigar si la disminución de los niveles de S-persulfuración al exponer a *S. cerevisiae* en fase estacionaria al H_2O_2 es debido a que aumenta alguna otra MPTox de mayor nivel de oxidación en cisteínas, por ejemplo, identificar con anticuerpos anti-S-sulfenilación o anti-S-sulfonilación. O, por el contrario, cuantificar los niveles de proteínas antioxidantes por western-blot con anticuerpos específicos si es debido al aumento de proteínas antioxidantes en fase estacionaria.

Por último, será necesario en ensayos posteriores analizar los efectos que tiene el H_2O_2 en la síntesis de la S-persulfuración. Analizar las enzimas que intervienen en la síntesis del H_2S por ser el principal compuesto que permite la formación de la MPTox. De entre estas enzimas sobresale Cys4, debido a que su homólogo en humano relaciona el estrés oxidativo generado por H_2O_2 con el aumento en la síntesis de H_2S .

REFERENCIAS

- Alcock, L. J., Perkins, M. V., & Chalker, J. M. (2018). Chemical methods for mapping cysteine oxidation. *Chemical Society Reviews*, 47(1), 231-268. <https://doi.org/10.1039/C7CS00607A>
- Auesukaree, C. (2017). Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124(2), 133-142. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.03.009>
- Benchoam, D., Cuevasanta, E., Möller, M. N., & Alvarez, B. (2020). Persulfides, at the crossroads between hydrogen sulfide and thiols. *Essays in Biochemistry*, 64(1), 155-168. <https://doi.org/10.1042/EBC20190049>
- Berterame, N. M., Martani, F., Porro, D., & Branduardi, P. (2018). Copper homeostasis as a target to improve *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to oxidative stress. *Metabolic Engineering*, 46, 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.02.010>
- Capdevila, D. A., Walsh, B. J. C., Zhang, Y., Dietrich, C., Gonzalez-Gutierrez, G., & Giedroc, D. P. (2021). Structural basis for persulfide-sensing specificity in a transcriptional regulator. *Nature Chemical Biology*, 17(1), 65-70. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00671-9>
- Cha, J.-Y., Park, J.-C., Jeon, B.-S., Lee, Y.-C., & Cho, Y.-S. (2004). Optimal fermentation conditions for enhanced glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 42(1), 51-55.

- Daskalova, A., Petrova, V., Velkova, L., Kujumdzieva, A., Tomova, A., Voelter, W., & Dolashka, P. (2021). Investigation of protein expression of *Saccharomyces cerevisiae* cells in quiescent and proliferating state before and after toxic stress. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 366-376. <https://doi.org/10.1080/13102818.2021.1879677>
- Dóka, É., Ida, T., Dagnell, M., Abiko, Y., Luong, N. C., Balog, N., Takata, T., Espinosa, B., Nishimura, A., Cheng, Q., Funato, Y., Miki, H., Fukuto, J. M., Prigge, J. R., Schmidt, E. E., Arnér, E. S. J., Kumagai, Y., Akaike, T., & Nagy, P. (2020). Control of protein function through oxidation and reduction of persulfidated states. *Science Advances*, 6(1), eaax8358. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax8358>
- eFarrugia, G., & eBalzan, R. (2012, junio 1). *Oxidative stress and programmed cell death in yeast*. *Frontiers in Oncology*; Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00064>
- Erdős, G., Mészáros, B., Reichmann, D., & Dosztányi, Z. (2019). Large-Scale Analysis of Redox-Sensitive Conditionally Disordered Protein Regions Reveals Their Widespread Nature and Key Roles in High-Level Eukaryotic Processes. *PROTEOMICS*, 19(6), 1800070. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800070>
- Fetherolf, M. M., Boyd, S. D., Taylor, A. B., Kim, H. J., Wohlschlegel, J. A., Blackburn, N. J., Hart, P. J., Winge, D. R., & Winkler, D. D. (2017). Copper-zinc superoxide dismutase is activated through a sulfenic acid intermediate

at a copper ion entry site. *Journal of Biological Chemistry*, 292(29), 12025-12040. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.775981>

- Filipovic, M. R., Zivanovic, J., Alvarez, B., & Banerjee, R. (2018). Chemical Biology of H₂S Signaling through Persulfidation. *Chemical Reviews*, 118(3), 1253-1337. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00205>
- Folch-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., & Robles, A. A. C. (2004). The stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 46(1-2), 24-46.
- Ford, A. E., Denicourt, C., & Morano, K. A. (2019). Thiol stress–dependent aggregation of the glycolytic enzyme triose phosphate isomerase in yeast and human cells. *Molecular Biology of the Cell*, 30(5), 554-565. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-10-0616>
- Freitas, J. M. D., Liba, A., Meneghini, R., Valentine, J. S., & Gralla, E. B. (2000). Yeast Lacking Cu-Zn Superoxide Dismutase Show Altered Iron Homeostasis ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN IRON METABOLISM. *Journal of Biological Chemistry*, 275(16), 11645-11649. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.16.11645>
- Fu, L., Liu, K., Ferreira, R. B., Carroll, K. S., & Yang, J. (2019). Proteome-wide analysis of cysteine S-sulfenylation using a benzothiazine-based probe. *Current protocols in protein science*, 95(1), e76. <https://doi.org/10.1002/cpps.76>
- Grant, C. M., Perrone, G., & Dawes, I. W. (1998). Glutathione and Catalase Provide Overlapping Defenses for Protection against Hydrogen Peroxide

in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(3), 893-898.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9864>

- Gray, J. V., Petsko, G. A., Johnston, G. C., Ringe, D., Singer, R. A., & Werner-Washburne, M. (2004). "Sleeping Beauty": Quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 187-206. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.187-206.2004>
- Gupta, R., Sahu, M., Tripathi, R., Ambasta, R. K., & Kumar, P. (2022). Protein S-sulfhydration: Unraveling the prospective of hydrogen sulfide in the brain, vasculature and neurological manifestations. *Ageing Research Reviews*, 76, 101579. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101579>
- Gupta, V., & Carroll, K. S. (2014). Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime. *Biochimica et biophysica acta*, 1840(2), 847-875. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.040>
- Hildebrandt, T., Knuesting, J., Berndt, C., Morgan, B., & Scheibe, R. (2015). Cytosolic thiol switches regulating basic cellular functions: GAPDH as an information hub? *Biological Chemistry*, 396(5), 523-537. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0295>
- Hu, Z., Killion, P. J., & Iyer, V. R. (2007). Genetic reconstruction of a functional transcriptional regulatory network. *Nature Genetics*, 39(5), 683-687. <https://doi.org/10.1038/ng2012>
- Huang, C.-W., Walker, M. E., Fedrizzi, B., Gardner, R. C., & Jiranek, V. (2017). Hydrogen sulfide and its roles in *Saccharomyces cerevisiae* in a

winemaking context. *FEMS Yeast Research*, 17(6).
<https://doi.org/10.1093/femsyr/fox058>

- Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, K., Izawa, S., & Kimura, A. (1999). Genetic Analysis of Glutathione Peroxidase in Oxidative Stress Response of *Saccharomyces cerevisiae* *. *Journal of Biological Chemistry*, 274(38), 27002-27009. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.38.27002>
- Kolluru, G. K., Shen, X., & Kevil, C. G. (2020). Reactive Sulfur Species. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 40(4), 874-884. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314084>
- Kriznik, A., Libiad, M., Le Cordier, H., Boukhenouna, S., Toledano, M. B., & Rahuel-Clermont, S. (2020). Dynamics of a Key Conformational Transition in the Mechanism of Peroxiredoxin Sulfinylation. *Acs Catalysis*, 10(5), 3326-3339. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b04471>
- Lévy, E., El Banna, N., Baille, D., Heneman-Masurel, A., Truchet, S., Rezaei, H., Huang, M.-E., Béringue, V., Martin, D., & Vernis, L. (2019). Causative Links between Protein Aggregation and Oxidative Stress: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16), 3896. <https://doi.org/10.3390/ijms20163896>
- Li, S., Yu, K., Wu, G., Zhang, Q., Wang, P., Zheng, J., Liu, Z.-X., Wang, J., Gao, X., & Cheng, H. (2021). pCysMod: Prediction of Multiple Cysteine Modifications Based on Deep Learning Framework. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2021.617366>

- Liu, H., Zartman, R. E., Ireland, T. R., & Sun, W. (2019). Global atmospheric oxygen variations recorded by Th/U systematics of igneous rocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(38), 18854-18859. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902833116>
- Maclsaac, K. D., Wang, T., Gordon, D. B., Gifford, D. K., Stormo, G. D., & Fraenkel, E. (2006). An improved map of conserved regulatory sites for *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Bioinformatics*, 7, 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-113>
- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H., & Fröhlich, K.-U. (1999). Oxygen Stress: A Regulator of Apoptosis in Yeast. *The Journal of Cell Biology*, 145(4), 757-767.
- Mager, W. H., & Winderickx, J. (2005). Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(5), 265-273. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.03.004>
- Marino, S. M., Li, Y., Fomenko, D. E., Agisheva, N., Cerny, R. L., & Gladyshev, V. N. (2010). Characterization of surface-exposed reactive cysteine residues in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 49(35), 7709-7721. <https://doi.org/10.1021/bi100677a>
- Miseta, A., & Csutora, P. (2000). Relationship Between the Occurrence of Cysteine in Proteins and the Complexity of Organisms. *Molecular Biology and Evolution*, 17(8), 1232-1239. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026406>

- Mitchell, A. R., Yuan, M., Morgan, H. P., McNae, I. W., Blackburn, E. A., Le Bihan, T., Homem, R. A., Yu, M., Loake, G. J., Michels, P. A., Wear, M. A., & Walkinshaw, M. D. (2018). Redox regulation of pyruvate kinase M2 by cysteine oxidation and S-nitrosation. *Biochemical Journal*, *475*(20), 3275-3291. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180556>
- Nishimura, A., Tanaka, T., Kato, Y., Nishiyama, K., & Nishida, M. (2022). Cardiac robustness regulated by reactive sulfur species. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, *70*(1), 1-6. <https://doi.org/10.3164/jcbn.21-84>
- Okazaki, S., Tachibana, T., Naganuma, A., Mano, N., & Kuge, S. (2007). Multistep Disulfide Bond Formation in Yap1 Is Required for Sensing and Transduction of H₂O₂ Stress Signal. *Molecular Cell*, *27*(4), 675-688. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.035>
- Peng, W., Zhang, M.-L., Zhang, J., & Chen, G. (2022). Potential role of hydrogen sulfide in central nervous system tumors: A narrative review. *Medical Gas Research*, *12*(1), 6-9. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.324590>
- Peralta, D., Bronowska, A. K., Morgan, B., Dóka, É., Van Laer, K., Nagy, P., Gräter, F., & Dick, T. P. (2015). A proton relay enhances H₂O₂ sensitivity of GAPDH to facilitate metabolic adaptation. *Nature Chemical Biology*, *11*(2), 156-163. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1720>
- Roger, F., Picazo, C., Reiter, W., Libiad, M., Asami, C., Hanzén, S., Gao, C., Lagniel, G., Welkenhuysen, N., Labarre, J., Nyström, T., Grøtli, M., Hartl, M., Toledano, M. B., & Molin, M. (2020). Peroxiredoxin promotes

- longevity and H₂O₂-resistance in yeast through redox-modulation of protein kinase A. *eLife*, 9, e60346. <https://doi.org/10.7554/eLife.60346>
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. En C. Guthrie & G. R. Fink (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 350, pp. 3-41). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50954-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50954-X)
 - Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, 11, 613-619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
 - Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(7), 363-383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
 - Sousa-Lopes, A., Antunes, F., Cyrne, L., & Marinho, H. S. (2004). Decreased cellular permeability to H₂O₂ protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase against oxidative stress. *FEBS Letters*, 578(1), 152-156. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.090>
 - Stone, J. R., & Yang, S. (2006). Hydrogen Peroxide: A Signaling Messenger. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(3-4), 243-270. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.243>
 - Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology*, 111, A3.B.1-A3.B.3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
 - Topf, U., Suppanz, I., Samluk, L., Wrobel, L., Böser, A., Sakowska, P., Knapp, B., Pietrzyk, M. K., Chacinska, A., & Warscheid, B. (2018).

- Quantitative proteomics identifies redox switches for global translation modulation by mitochondrially produced reactive oxygen species. *Nature Communications*, 9(1), 324. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02694-8>
- Vall-Illaura, N., Mir, N., Garrido, L., Vived, C., & Cabiscol, E. (2019, junio 1). *Redox control of yeast Sir2 activity is involved in acetic acid resistance and longevity*. *Redox Biology*; Elsevier. <https://doaj.org>
 - Wang, J., Jia, G., Li, H., Yan, S., Qian, J., Guo, X., Li, G., Qi, H., Zhu, Z., Wu, Y., He, W., & Niu, W. (2021). H₂O₂-Mediated Oxidative Stress Enhances Cystathionine γ -Lyase-Derived H₂S Synthesis via a Sulfenic Acid Intermediate. *Antioxidants*, 10(9), 1488. <https://doi.org/10.3390/antiox10091488>
 - Wang, J., Pareja, K. A., Kaiser, C. A., & Sevier, C. S. (2014). Redox signaling via the molecular chaperone BiP protects cells against endoplasmic reticulum-derived oxidative stress. *eLife*, 3, e03496. <https://doi.org/10.7554/eLife.03496>
 - Wang, P., Zhang, Q., Li, S., Cheng, B., Xue, H., Wei, Z., Shao, T., Liu, Z.-X., Cheng, H., & Wang, Z. (2021). iCysMod: An integrative database for protein cysteine modifications in eukaryotes. *Briefings in Bioinformatics*, 22(5). <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa400>
 - Werner-Washburne, M., & Singer, R. A. (1993). *Stationary Phase in the Yeast Saccharomyces cerevisiae*. 57, 19.
 - Xiao, H., Jedrychowski, M. P., Schweppe, D. K., Huttlin, E. L., Yu, Q., Heppner, D. E., Li, J., Long, J., Mills, E. L., Szpyt, J., He, Z., Du, G., Garrity,

- R., Reddy, A., Vaites, L. P., Paulo, J. A., Zhang, T., Gray, N. S., Gygi, S. P., & Chouchani, E. T. (2020). A quantitative tissue-specific landscape of protein redox regulation during aging. *Cell*, *180*(5), 968-983.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.012>
- Yang, C., Devarie-Baez, N. O., Hamsath, A., Fu, X., & Xian, M. (2020). S-Persulfidation: Chemistry, Chemical Biology, and Significance in Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, *33*(15), 1092-1114. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7889>
 - Yang, J., Gupta, V., Carroll, K. S., & Liebler, D. C. (2014). Site-specific mapping and quantification of protein S-sulphenylation in cells. *Nature Communications*, *5*(1), 4776. <https://doi.org/10.1038/ncomms5776>
 - Zakrajšek, T., Raspor, P., & Jamnik, P. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase as a model organism—Characterization at cellular and proteome level. *Journal of Proteomics*, *74*(12), 2837-2845. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.06.026>
 - Zhang, D., Macinkovic, I., Devarie-Baez, N. O., Pan, J., Park, C.-M., Carroll, K. S., Filipovic, M. R., & Xian, M. (2014). Detection of Protein S-Sulfhydration by a Tag-Switch Technique. *Angewandte Chemie International Edition*, *53*(2), 575-581. <https://doi.org/10.1002/anie.201305876>
 - Zivanovic, J., Kouroussis, E., Kohl, J. B., Adhikari, B., Bursac, B., Schott-Roux, S., Petrovic, D., Miljkovic, J. Lj., Thomas-Lopez, D., Jung, Y., Miler, M., Mitchell, S., Milosevic, V., Gomes, J. E., Benhar, M., Gonzalez-Zorn,

- B., Ivanovic-Burmazovic, I., Torregrossa, R., Mitchell, J. R., ... Filipovic, M. R. (2019). Selective Persulfide Detection Reveals Evolutionarily Conserved Antiaging Effects of S-Sulfhydration. *Cell Metabolism*, 30(6), 1152-1170.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.10.007>
- Zuhra, K., Tomé, C. S., Forte, E., Vicente, J. B., & Giuffrè, A. (2021). The multifaceted roles of sulfane sulfur species in cancer-associated processes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1862(2), 148338. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2020.148338>

ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas por ABC.

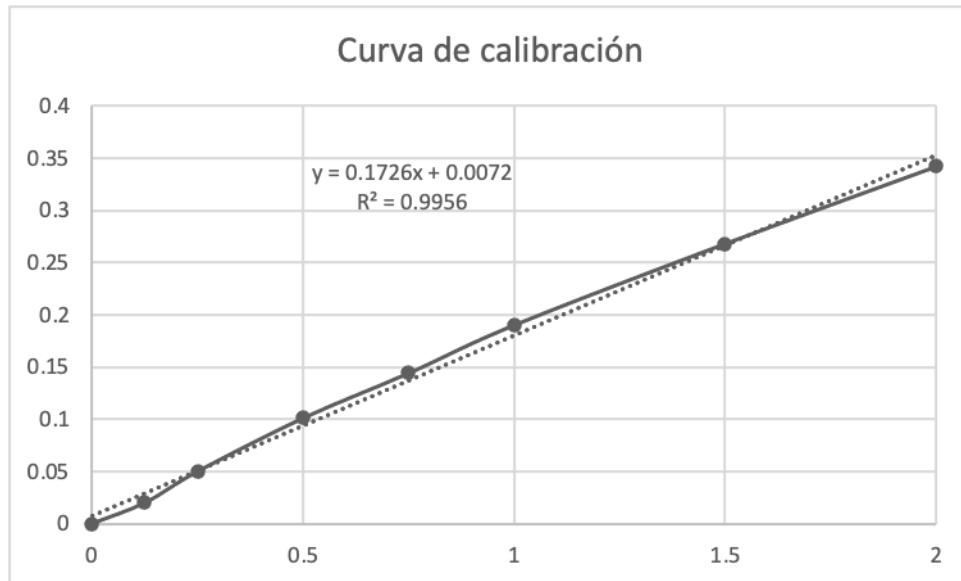


Figura 20. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas por ABC utilizando ABS como estándar.

Concentración de ABS (mg/mL)	Absorbancia a 562nm
0	0
0.125	0.02
0.25	0.05
0.5	0.101
0.75	0.144
1	0.19
1.5	0.268
2	0.342

Tabla 3. Valores de la curva de calibración para la cuantificación de proteínas por ABC utilizando ABS como estándar.

Anexo 2: Efecto del peróxido de hidrógeno en células de *S. cerevisiae* en fase exponencial y en fase estacionaria.

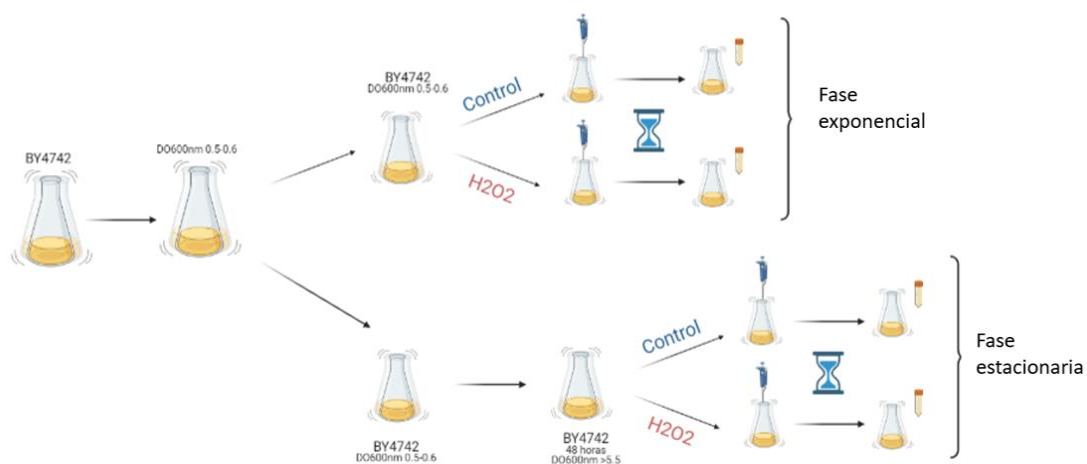


Figura 21. Esquema de la metodología para evaluar la fase exponencial y la fase estacionaria en *S. cerevisiae*.

Anexo 3: Análisis del volumen de banda por ImageJ de los resultados por western-blot

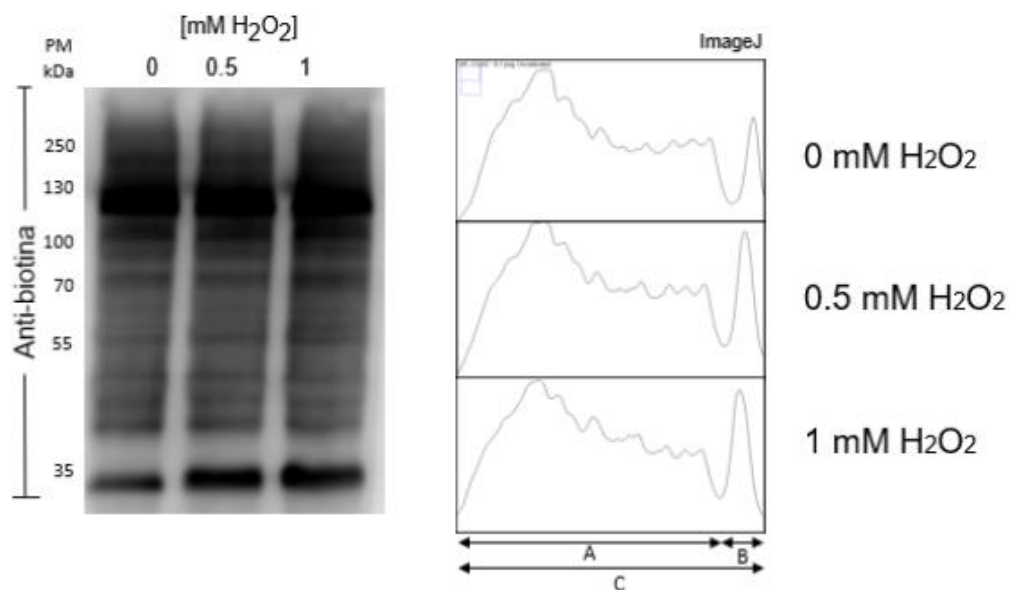


Figura 22. Análisis del marcaje de S-sulfenilación a 0, 0.5 y 1 mM H₂O₂ por ImageJ.

Muestra	Área	(Muestra/[0 mM H ₂ O ₂])
[0 mM H ₂ O ₂]	106243.432	1
[0.5 mM H ₂ O ₂]	104854.068	0.99
[1 mM H ₂ O ₂]	104579.432	0.98

Tabla 4. Área de la fracción A de la figura 22 y el cambio relativo con el grupo control (0 mM H₂O₂).

Muestra	Área	(Muestra/[0 mM H ₂ O ₂])
[0 mM H ₂ O ₂]	7010.619	1
[0.5 mM H ₂ O ₂]	11668.397	1.66
[1 mM H ₂ O ₂]	11812.811	1.68

Tabla 5. Área de la fracción B de la figura 22 y el cambio relativo con el grupo control (0 mM H₂O₂).

Muestra	Área	(Muestra/[0 mM H ₂ O ₂])
[0 mM H ₂ O ₂]	122783.808	1
[0.5 mM H ₂ O ₂]	144293.222	1.18
[1 mM H ₂ O ₂]	144091.93	1.17

Tabla 6. Área de la fracción C de la figura 22 y el cambio relativo con el grupo control (0 mM H₂O₂).

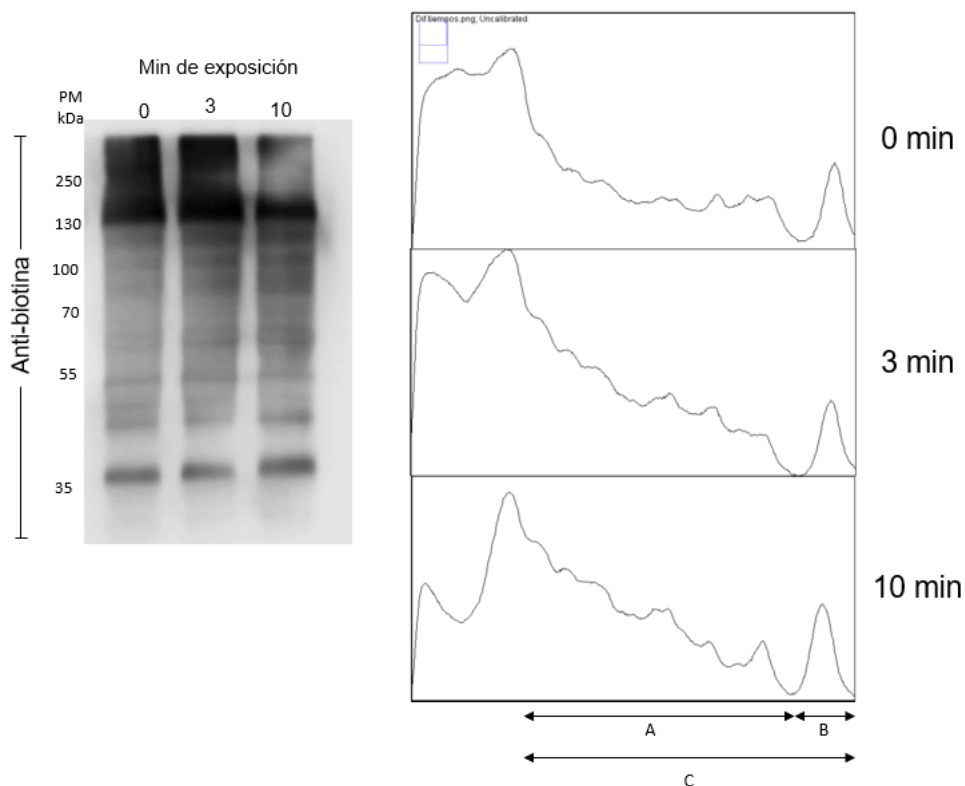


Figura 23. Análisis del marcaje de S-sulfenilación a 0, 3 y 10 minutos de exposición con 1 mM H₂O₂ por ImageJ.

Muestra	Área	(Muestra/[0 mM H ₂ O ₂])
0	29629.889	1
0.5	41853.283	1.4
10	44569.617	1.5

Tabla 7. Área de la fracción A de la figura 23 y el cambio relativo con el grupo control (0 min).

Muestra	Área	(Muestra/[0 mM H ₂ O ₂])
0	3435.841	1
0.5	3586.205	1
10	4420.397	1.3

Tabla 8. Área de la fracción B de la figura 23 y el cambio relativo con el grupo control (0 min).

Muestra	Área	(Muestra/[0 mM H ₂ O ₂])
0	34731.852	1
0.5	45304.245	1.30
10	50093.257	1.44

Tabla 9. Área de la fracción C de la figura 23 y el cambio relativo con el grupo control (0 min).

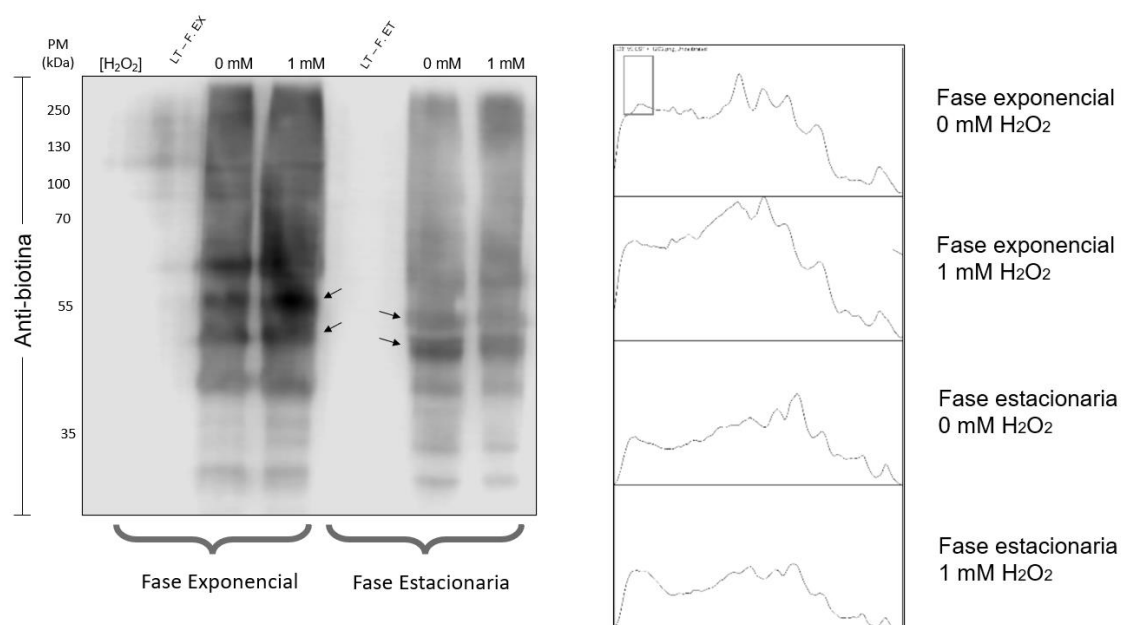


Figura 24. Análisis del marcaje de S-sulfenilación en proteínas de células en fase exponencial y fase estacionaria con 1 mM H₂O₂ por ImageJ.

Muestra	Área	(Muestra/ [0 mM H ₂ O ₂ Misma fase])
0 mM H₂O₂ Fase Exponencial	102098.24	1
1 mM H₂O₂ Fase Exponencial	124385.654	1.22
0 mM H₂O₂ Fase Estacionaria	68135.864	1
1 mM H₂O₂ Fase Estacionaria	57481.207	0.84

Tabla 10. Área total de la figura 24 y el cambio relativo con el grupo control (0 min) en la misma fase celular.

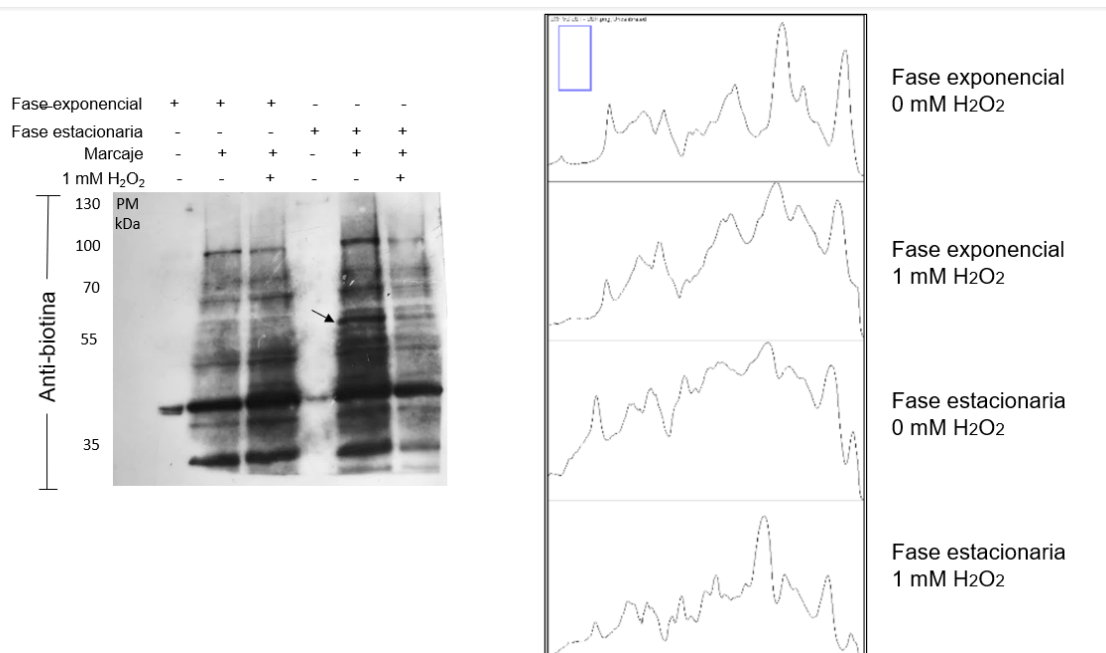


Figura 25. Análisis del marcaje de S-persulfuración en proteínas de células en fase exponencial y fase estacionaria con 1 mM H₂O₂ por ImageJ.

Muestra	Área	(Muestra/ [0 mM H ₂ O ₂ Misma fase.]
0 mM H₂O₂ Fase Exponencial	60420.165	1
1 mM H₂O₂ Fase Exponencial	93820.964	1.55
0 mM H₂O₂ Fase Estacionaria	117639.843	1
1 mM H₂O₂ Fase Estacionaria	44595.722	0.38

Tabla 11. Área total de la figura 25 y el cambio relativo con el grupo control (0 min) en la misma fase celular.

Muestra	Área	(Muestra/ [0 mM H₂O₂ Misma fase])	(Muestra/ [0 mM H₂O₂ Fase Exp])
0 mM H₂O₂ Fase Exponencial	3339.456	1	1
1 mM H₂O₂ Fase Exponencial	5467.406	1.64	1
0 mM H₂O₂ Fase Estacionaria	14434.376	1	4.32
1 mM H₂O₂ Fase Estacionaria	4565.305	0.32	0.83

Tabla 12. Área de la banda señalada en la figura 25 y el cambio relativo con el grupo control (0 min) en la misma fase celular y la fase exponencial.

Anexo 4: Materiales y equipos

1. Materiales

1.1. Reactivos

Reactivos	Marca	Referencia
Solución al 30 wt % de peróxido de hidrógeno en H ₂ O	Sigma-Aldrich	216763
HPDP-biotina	Chem Cruz	Sc-207359
S-Metil metanotiosulfonato	Sigma-Aldrich	64306
DL-Ditiotreitol	Sigma-Aldrich	D0632
Neocuproina ≥98 %	Sigma-Aldrich	N1501
Ácido tricloroacético reactivo ACS ≥99.0 %	Sigma-Aldrich	T6399
Dodecilsulfato sódico ≥98.5 %	Sigma-Aldrich	L3771
α-iodoacetamida	Millipore	407710
N,N,N'-Tetramethyl-ethylenediamine 99 %	Sigma-Aldrich	T9281
Tween® 20	Sigma-Aldrich	P1379
Urea ultra PURE ≥99.5 %	Life Technologies	15505-035
cOmplete Mini – Tabletas de coctel de inhibidores de proteasas	Roche	39922700
HEPES ≥99.5 %	Sigma-Aldrich	H3375
Ácido etilendiaminotetraacético ≥98.5 %	Sigma-Aldrich	ED
Trizma® base	Sigma-Aldrich	T1503
Glicina	Sigma-Aldrich	G8898
Acrilamida	Sigma-Aldrich	A3553
Persulfato de amonio	Sigma-Aldrich	A3678
Ácido Clorhídrico	High Purity	A1360
Cloruro de sodio, cristal 99.0%	J.T. Baker	3624-01
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	Sigma-Aldrich	P7626
GBX Fijador y Reforzador	Carestream DENTAL	515 8605
GBX Revelador y Reforzador	Carestream DENTAL	515 8597
Solventes	Marca	Referencia
Acetona RA ≥99.5 %	Tecsiquim	AT0075-7
Metanol RA ≥99.8 %	Tecsiquim	MT2505-7
Ácido acético glacial 99.9 %	Baker Analyzed	9507
Dimetil sulfoxido, mínimo 99.5 % GC	Sigma-Aldrich	D5879
Nutrientes	Marca	Referencia
Dextrosa anhidra RA	Tecsiquim	DT1225-9
Peptona bacteriológica	MCD LAB	9227A
Agar bacteriológico	MCD LAB	9017A
Extracto de levadura	MCD LAB	9037

Colorantes	Marca	Referencia
Coomassie Azul Brillante	BIO-RAD	1610406
Ponceau S (C.I. 27195)	Millipore	ND*
Azul de Bromofenol	Sigma-Aldrich	B-5525
Otros	Marca	Referencia
Immobilon ® Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore	WBKLS0500
PageRuler TM Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific	26619
Albumina de Suero Bovino	Sigma-Aldrich	A2153
Filtro 0.22 µm Blanco cadrulado 47 mm	Millipore	GSWG047S6
Svelty, 53.1 % leche	Nestlé	NA
Perlas de vidrio 425-600 microns	Sigma-Aldrich	G-8772
Medical X-ray Blue / MXB Film	Carestream	860 9893

Tabla 13. Reactivos.

1.2. Medios de cultivo

1.2.1. Caldo YPD (receta 1)

1% Extracto de levadura
 2% Dextrosa anhidra
 2% Peptona bacteriológica

1.2.2. Agar YPD (receta 2)

1% Extracto de levadura
 2% Dextrosa anhidra
 2% Peptona bacteriológica
 2% Agar bacteriológico

1.3. Amortiguadores

1.3.1. Amortiguador desnaturalizante (receta 3)

25 mM Tris-HCl, pH 7.5
 10 mM EDTA
 8 M Urea
 SDS 0.5%

Procedimiento: Filtrar (filtro de 0.22 µm) y guardar a -20 °C.

1.3.2. Amortiguador para resuspender muestras sulfeniladas (receta 4)

20 mM Tris-HCl pH 7.5
 1 mM EDTA
 SDS 1%

1.3.3. Amortiguador de lisis HEN (receta 5)

250 mM HEPES pH 7.7
1 mM EDTA
150 mM NaCl
1 mM PMSF
0.5% SDS
100 μ M neocuproina
100 μ M deferoxamina
1X inhibidores de proteasas

1.3.4. Amortiguador HEN (receta 6)

250 mM HEPES pH 7.7
1 mM EDTA
150 mM NaCl (opcional, mejora la precipitación de proteínas)

1.3.5. Amortiguador HENS (receta 7)

250 mM HEPES pH 7.7
1 mM EDTA
150 mM NaCl (opcional, mejora la precipitación de proteínas)
SDS 1%

1.3.6. Amortiguador HENS más neocuproina y deferoxamina (receta 8)

250 mM HEPES pH 7.7
1 mM EDTA
150 mM NaCl (opcional, mejora la precipitación de proteínas)
SDS 1%
100 μ M neocuproina
150 μ M deferoxamina

1.3.7. TBS 10X (Receta 9)

24.23 g Trizma base
80.06 g NaCl
Procedimiento: Disolver ambos reactivos en 800 mL de agua, ajustar pH a 7.6 con HCl y aforar a 1 L.

1.3.8. TBS-T (Receta 10)

100 mL TBS 10X (receta 7)
900 mL agua destilada
1 mL Tween 20

1.3.9. Amortiguador de corrida 10X (receta 11)

30.3 g Trizma
144 g Glicina
10 g SDS
Aforar a 1 L.

1.3.10. Amortiguador de transferencia 10X (receta 12)

30.3 g Trizma
144.1 g Glicina
Aforar a 1 L.

1.3.11. Amortiguador de muestras 2X (no reductor) (receta 13)

7.0 mL 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
3.0 mL Glicerol
1.028 g SDS
1.2 mg Azul de bromofenol

1.4. Soluciones

1.4.1. Ácido tricloroacético al 100% (receta 14)

500 g ACT
227 mL Agua destilada

1.4.2. Acrilamida/Bis (receta 15)

87.6 g acrilamida (29.2 g/100 mL)
2.4 g N'N'-bis-metilen-acrilamida (0.8 g/100 mL)
Procedimiento: Aforar a 300 mL y filtrar.

1.4.3. Gel resolving 10% (receta 16)

4.1 mL Agua destilada
3.3 mL Acrilamida/Bis (receta 15)
2.5 mL amortiguador 1.5 M Tris-HCl pH 8.8
100 μ L SDS 10%
50 μ L PSA
10 μ L TEMED

1.4.4. Gel stacking 5% (receta 17)

2.85 mL Agua destilada
0.85 mL Acrilamida/Bis (receta 15)
1.25 mL amortiguador 1.5 M Tris-HCl pH 8.8
50 μ L SDS 10%

25 µL PSA
10 µL TEMED

1.4.5. Solución de trabajo (receta 18)

50 partes de reactivo A (carbonato de sodio y ácido bicinconínico)
1 parte de reactivo B (sulfato de cobre[II]).

1.4.6. Solución de Coomassie (receta 19)

500 mL Metanol
100 mL Ácido acético glacial (añadir al final)
1.25 g Azul brillante
400 mL Agua destilada

1.4.7. Solución para desteñir geles con Coomassie (receta 20)

25 mL Metanol
37.5 mL Ácido acético glacial (añadir al final)
437.5 mL Agua destilada

1.5. Anticuerpos

Anticuerpo	Marca	Referencia
PGK1 Monoclonal Antibody	Invitrogen	459250
Monoclonal Anti-Biotin-Peroxidase antibody produced in mouse	Sigma-Aldrich	A0185
Peroxidase Labeled Affinity Purified Antibody to Mouse IgG (H+L) [Goat] HAS	KPL	04-18-06
GAPDH Antibody	GeneTex	GTX100118
Peroxidase Affini Pure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	111-035-003

Tabla 14. Anticuerpos.

1.5.1. Equipos

Equipo	Marca	Modelo
Speed Vac Concentrator	Savants Instruments Inc.	RH20-12
Centrífuga	Hettich Zentrifugen	Universal 320 R
Centrífuga	eppendorf	5418R
Nanodrop	Thermo Scientific	Nanodrop 2000
Cámara deelectrophoresis/transferencia	Bio-Rad	Mini-PROTEAN Tetra Cell
C-DiGit® Blot Scanner	LI-COR	
Microscopio	Olympus	BX-51

Tabla 15. Equipos.

Anexo 5: Secuencia FASTA de Ssc1 (mtHSP70)

```
>SSC1 YJR045C SGDID:S000003806
MLAAKNILNRSSLSSSFRIATRLQSTKVQGSVIGIDLGTTNSAVAIMEGKVPKIIIE
NAEGSRTPSVVAFTKEGERLVGIPAKRQAVVNPENTLFATKRLIGRRFEDAIEV
QRDIKQVPYKIVKHSNGDAWVEARGQTYSPAQIGGFVLNKMKETAEAYLGKPV
KNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGQIVGLNVLRVVNEPTAAALAYGLEKSDSKV
VAVFDLGGGTFDISILDIDNGVFEVKSTNGDTHLGGEDFDIYLLREIVSRFKTET
GIDLENDRMAIQRIREAIEKAKIELSSTVSTEINLPPFITADASGPKHINMKFSRAQ
FETLTAPLVKRTVDPVKKALKDAGLSTSDISEVLLVGGMSRMPKVETVKSLFG
KDPSKAVNPDEAVAIGA AVQGAVLSGEVTDVLLLDVTPLSLGIETLGGVFTRLIP
RNTTIPTKKSQIFSTAAAGQTSVEIRVFQGERELVRDNKLIGNFTLAGIPPAPKG
VPQIEVTFDIDADGIINVSARDKATNKDSSITVAGSSGLSENEIEQMVNDAEKFK
SQDEARKQAIETANKADQLANDTENSLEFEGKVDKAEAQKVRDQITSLKELV
ARVQGGEEVNAEELKTKTEELQTSSMKLFEQLYKNDSNNNNNNNGNNAESG
ETKQ*
```