



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**DINÁMICA DE MODIFICACIONES
POSTRADUCCIONALES EN LOS RESIDUOS DE
CISTEÍNA DE MUTANTES QUE ACUMULAN NO Y
 H_2O_2**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

P R E S E N T A :

KEVIN OMAR TORRES MARCIAL

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. FRANCISCO TORRES QUIROZ**

2022





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

I. AGRADECIMIENTOS.....	4
II. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	7
III. ABREVIATURAS.....	9
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	11
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo genético.....	11
1.2 Cisteína: Interruptor molecular en estrés.....	12
1.3 Biología del óxido nítrico (NO)	15
1.4 Nitrosilación como resultado del estrés nitroso	17
1.5 Biología del estrés oxidativo y ROS	19
1.6 Sulfenilación como producto de la oxidación de ROS.....	20
1.7 Crosstalk de gasotransmisores: NO y H ₂ S	21
1.8 Crosstalk de gasotransmisores: H ₂ S y H ₂ O ₂	27
2. JUSTIFICACIÓN.....	30
3. HIPOTESIS	31
4. OBJETIVO GENERAL.....	31
4.1 Objetivos Particulares	31
5. MATERIAL Y MÉTODO.	32
5.1 Plásmidos	33
5.2 Oligonucleótidos	34
5.3 Uso de Bases de Datos	35
5.4 Generación de mutantes en <i>S. cerevisiae</i>	35
5.5 Construcción de cepas dobles mutantes: $\Delta yhb1$, $\Delta sfa1$ y $\Delta cta1, \Delta ctt1$	37
5.5.1 PCR para hibridar plásmido con oligonucleótidos <i>Forward</i> y <i>Reverse</i>	37
5.5.2 Células competentes mutantes.....	38
5.5.3 Transformación de células competentes	38
5.6 Identificación de proteínas modificadas (-SSH y -SOH).....	39
5.6.1 Cultivos celulares para proteínas modificadas.....	39
5.6.2 Cuantificación de proteínas.....	39
5.6.3 Marcaje con Biotina-HPDP de grupos -SSH	39
5.6.4 Marcaje con Biotina-HPDP de grupos -SOH	40

5.7 Identificación de MPT (Modificaciones postraduccionales)	41
6. RESULTADOS	42
6.1 Relaciones genéticas por STRING de los genes <i>YHB1</i> y <i>SFA1</i>	42
6.2 Relaciones genéticas de catalasas.....	44
6.3 Generación de mutantes simples de cada gen Δ <i>cta1</i> , Δ <i>ctt1</i> , Δ <i>sfa1</i> y Δ <i>yhb1</i>	45
6.4 Generación de mutantes dobles Δ <i>cta1</i> , Δ <i>ctt1</i> y Δ <i>sfa1</i> , Δ <i>yhb1</i>	50
6.5 Patrón postraducciona l de la S-Persulfuración	53
6.6 Patrón postraducciona l de la S-Sulfenilación.....	54
7. DISCUSIÓN.....	56
7.1 Redes genéticas y mutantes que acumulan RNS y ROS	56
7.2 Persulfuración de mutantes que acumulan ROS y RNS	58
7.3 Sulfenilación en mutantes que acumulan ROS y RNS	61
8. CONCLUSIONES	64
8.1 Perspectivas	64
9. REFERENCIAS.....	65
10. ANEXOS	72

I. AGRADECIMIENTOS

Este proyecto no hubiera sido posible sin la colaboración, tutoría y dirección del Dr. Francisco Torres Quiroz, le agradezco toda la confianza depositada en mí. De igual manera, agradezco la paciencia y el asesoramiento técnico a la Dra. Paola Moreno Álvarez.

Deseo agradecer a mi asesora de tesis, la profesora y bióloga Ma. Del Socorro Sánchez Correa por entenderme como estudiante, su inestimable ayuda intelectual y darme sus mejores críticas.

A mis compañeros del laboratorio 102 por recibirme con los brazos abiertos y hacerme sentir siempre en casa.

A mi profesor Biólogo del CCH, Julio Cesar Pantoja Castro, por inspirarme a estudiar y servir a una de las ciencias más hermosas que pudo haber existido.

A mis compañeros inseparables de laboratorio y campo, Ma. Del Rocío, Janette y Arath, por aquellos largos debates de enriquecimiento intelectual y de diversión en la carrera.

A mi comunidad Iztacalteca, Tonantzin, Fernando, Tomás y Leo, por complementar la otra parte de mi vida no académica en la facultad y fomentar la autocrítica en todos nuestros actos sociales.

A mis hermanos que no son de sangre, pero demostraron lealtad.

Y por último y no menos importante, agradezco eternamente a mi Mamá Ale y mis hermanas Nadia y Yunuen que siempre me han apoyado y me han dado sus mejores momentos en mis peores días. Gracias por dejarme crecer con ustedes para ser un mejor hombre, mi admiración es para ustedes.

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

Este trabajo se ha realizado en el laboratorio 102-Oriente del Departamento de Bioquímica y Biología Estructural en el Instituto de Fisiología Celular contando con la asesoría técnica y préstamo de equipo de la Unidad de Biología Molecular del Instituto a cargo de: Dra. Laura Ongay Larios, Biól. María Guadalupe Codiz Huerta y la M. en C. Minerva Mora Cabrera.

También se agradece al Dr. Roberto Coria, la Dra. Laura Kawazaki y a los miembros de su laboratorio por las facilidades y el préstamo de materiales.

“La obligación de sufrir nos da el derecho de conocer”

J. Rostand

II. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1.1 Células de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
Figura 1.2 Modelo propuesto del efecto del H ₂ S en la cisteína de p66SHC, mediado en estrés oxidativo por ROS.....	13
Figura 1.3 Quimiotipos de cisteína fisiológicamente relevantes.. ..	14
Figura 1.4 Representación 3-D de la estructura cristalina de <i>YHB1</i>	15
Figura 1.5 Modelo propuesto para la regulación de la muerte celular por una enzima que actúa como <i>NOS</i> en <i>S. cerevisiae</i>	16
Figura 1.6 Modelo propuesto para la homeostasis del NO y su regulación en el estrés oxidativo	19
Figura 1.7 Tres diferentes vías en las que trabajan las glutarredoxinas monotiólicas con glutatión.....	21
Figura 1.8 Generación de H ₂ S ₂ y H ₂ S ₃ por la interacción de NO-H ₂ S y efecto en los canales <i>TRPA1</i>	22
Figura 1.9 Formación de HNO es dependiente de H ₂ S y NO.....	24
Figura 1.10 Esquematación de la interacción por NO y H ₂ S.....	25
Figura 1.11 Relajaciones inducidas por Acetilcolina (ACh) de células endoteliales del músculo liso de arterias mesentéricas.....	27
Figura 1.12 Afinidad de H ₂ S para reaccionar con ácidos sulfénicos, pero no con disulfuros: mecanismo base de la persulfuración intracelular.	28
Figura 1.13 Rol fisiológico hipotético para los sistemas de tiorredoxinas y glutarredoxinas (Trx/Grx).	29
Figura 5.1 Esquema del proceso de delección de un gen en Levadura	36
Figura 5.2 Programa para amplificación utilizado para generar productos de PCR con oligonucleótidos <i>Forward</i> y <i>Reverse</i> para hibridar con plásmidos	37
Figura 5.3 Programa para amplificación utilizado para generar productos de PCR con oligonucleótidos A, D y TEF-1FromTest utilizando como molde el ADN de nuestras cepas mutantes.....	38
Figura 6.1 Red genética propuesta por STRING para el gen <i>YHB1</i>	42
Figura 6.2 Red genética propuesta por STRING para el gen <i>SFA1</i>	44
Figura 6.3 Red genética propuesta por STRING para el gen <i>CTT1</i>	45
Figura 6.4 Electroforesis de la hibridación de <i>primers</i> y <i>CTA1</i>	47
Figura 6.5 Electroforesis de cepas mutantes del gen <i>CTA1</i> usando los oligonucleótidos “A” y “D”	48

Figura 6.6 Electroforesis de confirmación de cepas mutantes del gen <i>CTA1</i> usando el oligonucleótido especial <i>TEFpromTest</i> y “A”	49
Figura 6.7 Electroforesis de confirmación de cepas dobles mutantes $\Delta yhb1:\Delta sfa1$ y $\Delta cta1:\Delta ctt1$ usando los oligonucleótidos “A” y “D”	51
Figura 6.8 Electroforesis de confirmación de cepas dobles mutantes $\Delta yhb1:\Delta sfa1$ y $\Delta cta1:\Delta ctt1$ usando los oligonucleótidos “A” y <i>TEFpromtest</i>	52
Figura 6.9 Electroforesis del total de proteínas (izquierda) y Western Blotting de proteínas persulfuradas (derecha)	54
Figura 6.10 Electroforesis del total de proteína (izquierda) y Western Blotting de proteínas sulfeniladas (derecha)	55
Figura 10.1 Mapa genético del plásmido pAG32	72
Figura 10.2 Mapa Genético del plásmido pAG25	73
Figura 10.3 Mapa genético del plásmido pUG6	74

TABLAS

Tabla 5.1 Oligonucleótidos diseñados a partir del programa <i>Serial-Cloner</i> versión 2.6	32
Tabla 6.1 Predicciones del tamaño de los fragmentos esperados para cada cepa en relación con el vector utilizado, para ello se utilizó el programa <i>Serial-Cloner</i> versión 2.6	42

III. ABREVIATURAS

NO	óxido nítrico
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogeno
H ₂ S	sulfuro de hidrogeno
CO	monóxido de carbono
O ₂	oxígeno atmosférico
NO ₂	dióxido de nitrógeno
SH	tiol
SNO	s-nitrosotiol
SSH	s-persulfuración
SOH	s-sulfenilación
GSNO	nitroso glutatión
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
CoA	s-acetil coenzima A
Fe	hierro
Ca	calcio
Mg	magnesio
LiOAc	acetato de Litio
ADN	ácido desoxirribonucleico
ROS	radical oxygen species (especies reactivas de oxígeno)
RNS	radical nitrogen species (especies reactivas de nitrógeno)
RSS	radical sulfur species (especies reactivas de azufre)
NOS	óxido nítrico sintasa
GSNOR	nitroso glutatión reductasa
NIR	nitrito reductasa
Tah18	flavoproteína Tah18
Dre2	proteína de ensamblaje de Fe-S
clonNAT	nourseotricina N-acetil transferasa
G418	geneicina
YPD	medio de extracto de levadura, peptona y dextrosa.

pKa	constante de disociación
Kpb	mil pares de bases
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
D.O	densidad óptica
primer	oligonucleótido corto (aprox.19 pb)
ORF	marco abierto de lectura de un gen
MPox	modificaciones postraduccionales oxidativas
rpm	revoluciones por minuto
°C	grados Celsius
hrs	horas
min	minutos
seg	segundos

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo genético.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1.1) es un hongo unicelular sencillo en cuanto a la estructura y contenido de material genético. Con sólo 16 cromosomas haploides y con un tamaño que va de 200 - 2,200 kpb, del cual los genes representan un 72% del total. Por su rápido crecimiento, su baja complejidad genética y su ADN altamente compacto, desde hace tiempo se le ha utilizado como un modelo para ser manipulado fácilmente por técnicas de ingeniería genética (Sherman, 2002).

El genoma de *S. cerevisiae* fue el primer genoma de un Eukaryota en ser secuenciado, por lo que se convierte en un espécimen clave para la investigación del transcriptoma, así como para analizar la fisiología de los productos génicos, y para el estudio bioquímico de las diferentes vías de señalización celular que regulan procesos celulares que son compartidos filogenéticamente con otros organismos como los humanos (Sherman, 2002).

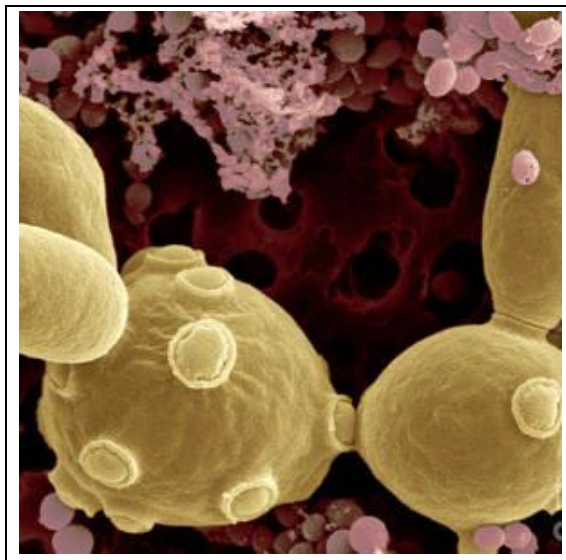


Figura 1.1 Células de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Imagen tomada de Scimat Science Source <https://pixels.com/profiles/photo-researchers-inc>

1.2 Cisteína: Interruptor molecular en estrés

Las especies reactivas de oxígeno, nitrógeno y azufre, abreviados en inglés como ROS, RNS, y RSS, respectivamente, han demostrado fungir como segundos mensajeros dirigidos con funciones reguladoras en diferentes contextos fisiológicos, de modo que cambian el estado estequiométrico y redox celular. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que tienen esos efectos no se han estudiado a detalle, ni toda la gama de probabilidades de los efectos biológicos que puedan generar, por ello nos interesa explorar en proteómica, el paisaje de modificaciones postraduccionales (Hess *et al.*, 2005 y Montagna *et al.*, 2020). Con el paso del tiempo, se ha venido formando un nuevo paradigma en cuanto a la fisiología de las especies reactivas, ya que se ha encontrado que tienen toda una base molecular para mediar la respuesta a diferentes estímulos (Figura 1.2). Ahora sabemos que la generación de estas especies reactivas modifica covalentemente, y de manera específica a una proteína, lo que representa un nuevo mecanismo molecular prominente para transformar un oxidante en una respuesta biológica (Montagna *et al.*, 2020).

La cisteína es el único aminoácido azufrado que gracias a sus propiedades fisicoquímicas de la cadena lateral del grupo tiol (-SH) como los múltiples estados de oxidación (-2 a +6), a pH fisiológico tiende a desprotonarse convirtiéndose en un gran nucleófilo y blanco para muchas especies electrófilas para perpetuar la señal. De hecho, Winterbourn y Hampton, ya habían observado que el anión tiolato reaccionaba con peróxido de hidrogeno (estructura química). Además, demostraron que el pKa bajo era determinante para favorecer la reactividad oxidante del tiol de la cisteína, dándole una posición única en biología por la diversidad de quimiotipos que forma (Pulsen y Carroll, 2013).

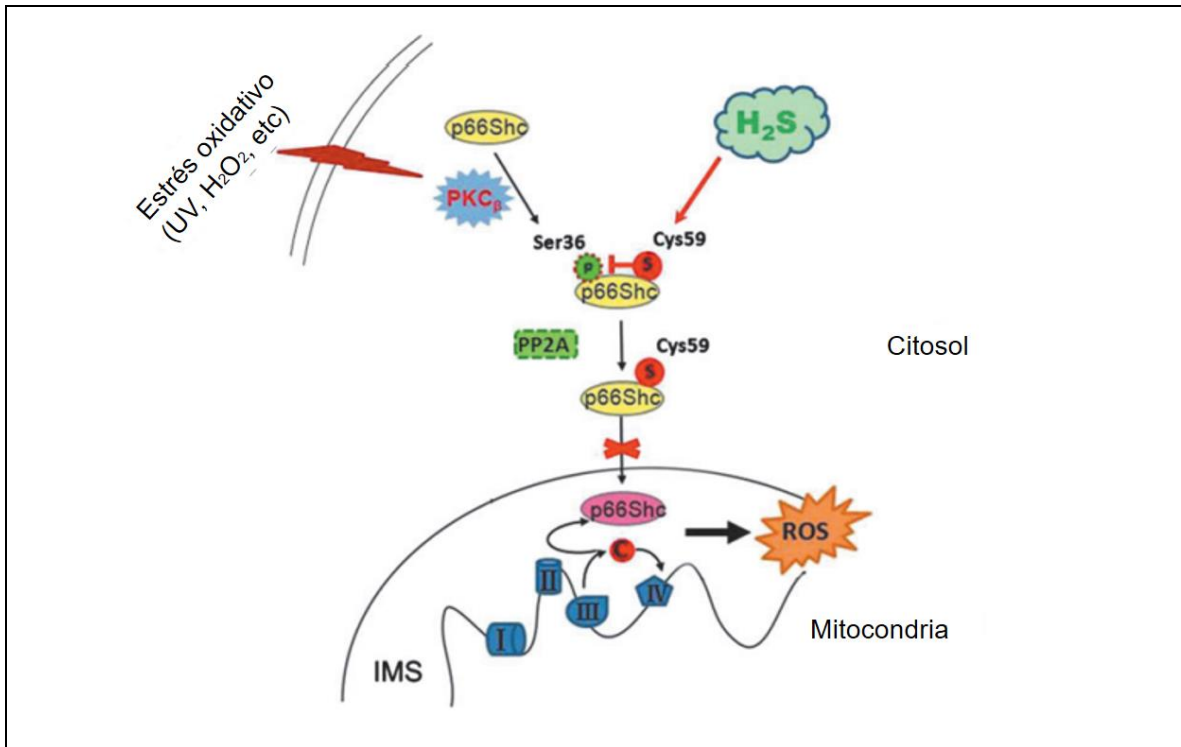


Figura 1.2 Modelo propuesto del efecto del H₂S en la cisteína de p66SHC, mediado en estrés oxidativo por ROS. H₂S persulfura la cisteína 59 de la p66Shc. La modificación disrumpe la asociación de PKCβ y p66Shc, impidiendo su propia translocación a las mitocondrias y, por lo tanto, disminuye la producción de ROS mitocondrial. Tomada y modificada de Xie *et al.*, 2014

Por si fuera poco, los derivados redox de cisteína tiende a formar un espectro de modificaciones postraduccionales de las que dependerán mecanismos de regulación para una gran variedad de clases de proteínas (Figura 1.3). Entre todo este intervalo de modificaciones se encuentran las que son reversibles y reguladas: disulfuros, tiosulfatos, S-glutationilación, S-nitrosilación, ácidos sulfénicos, sulfonamidas, sulfenamidas y persulfuros. En conjunción con especies súper-oxidantes que son irreversibles, como: ácidos sulfínicos, ácidos sulfónicos y sulfonamidas que a menudo se consideran características del estrés oxidativo y la enfermedad (Pulsen y Carroll, 2013).

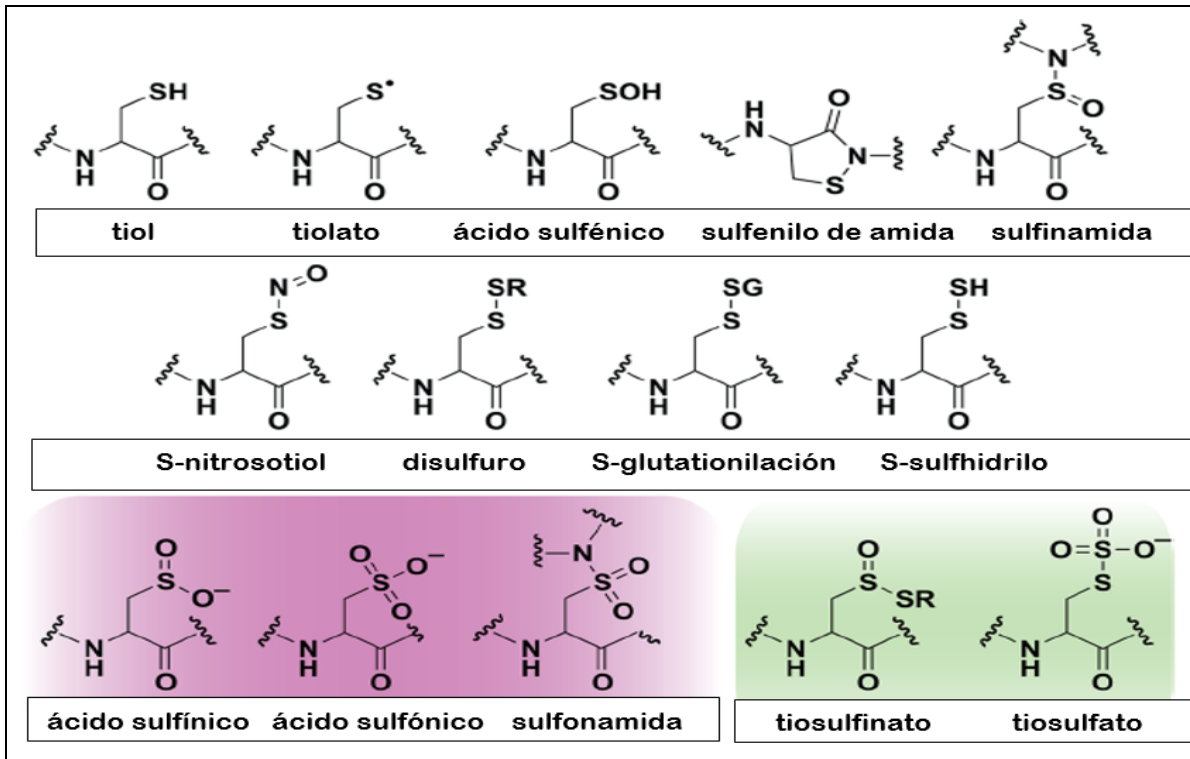


Figura 1.3 Quimiotipos de cisteína fisiológicamente relevantes. Rojo, modificaciones irreversibles. Verde, únicos intermediarios de enzimas. Tomado y modificado de Pulsen y Caroll, 2013.

La orientación que toma en los plegamientos, entre otras razones, hace que se convierta en los aminoácidos más modificados bioquímicamente e importantes para la integridad estructural y la funcionalidad de las proteínas (Gould *et al.*, 2016) (Figura 1.4). Los residuos de cisteína son indispensables para la unión a iones metálicos conformando los dominios de metaloproteínas, enlaces disulfuro entre subunidades, en la acción catalítica de algunas fosfatasas, ácil-transferasas y oxidorreductasas, entre otras funciones moleculares precisamente son estos residuos blanco de modificaciones que en el 80% de los sitios mapeados es dominado sólo por una modificación, asimismo, es específico en el caso de que llegue haber más cisteínas en una proteína (Gould *et al.*, 2016).



Figura 1.4 Representación 3-D de la estructura cristalina de YHB1. Flavoproteína con su coenzima Flavina Adenina Dinucleótido (*FAD*), su sitio activo de protoporfirina IX que contiene el grupo hemo (en verde). Cisteínas 212, 297, 328 y 362 con el azufre marcado en amarillo. Flavina perteneciente de *S. cerevisiae* y conservada evolutivamente. Tomada de PDB: <https://www.rcsb.org/3d-view/4G1V/1>

1.3 Biología del óxido nítrico (NO)

El NO es el primer gasotransmisor relacionado con la regulación de la presión arterial, la inmunidad y la neurotransmisión, entre otros papeles importantes en la fisiología. Se ha identificado como una molécula reactiva y tóxica que, debido a su electrón desapareado lo convierte en un radical libre y funge como un gasotransmisor, como el CO y H₂S. La biosíntesis de NO se origina por diferentes

vías, una de ellas es bien conocida en mamíferos comandada por NOS (óxido nítrico sintasa) consiste en dos dominios: oxigenasa y reductasa. El dominio reductasa toma electrones de *NADPH* y reduce O_2 del dominio oxigenasa para activarlo y posteriormente oxidar L-Arginina, para convertir NO y citrulina. La otra forma de producir NO es por *NIR* (nitrito reductasa) (Santolini, 2011; Altaany *et al.*, 2014). Lo más interesante es que en levaduras y plantas no se ha identificado a un ortólogo de NOS; sin embargo, flavoproteínas como *Tah18* han tomado la actividad de NOSintasa a altas temperaturas y en exposición a H_2O_2 . En esos estados de estrés el NO puede señalizar sistémicamente la muerte celular programada en *S. cerevisiae* (Figura 1.5) (Almeida *et al.*, 2007; Nishimura *et al.*, 2013; Yoshikawa *et al.*, 2018).

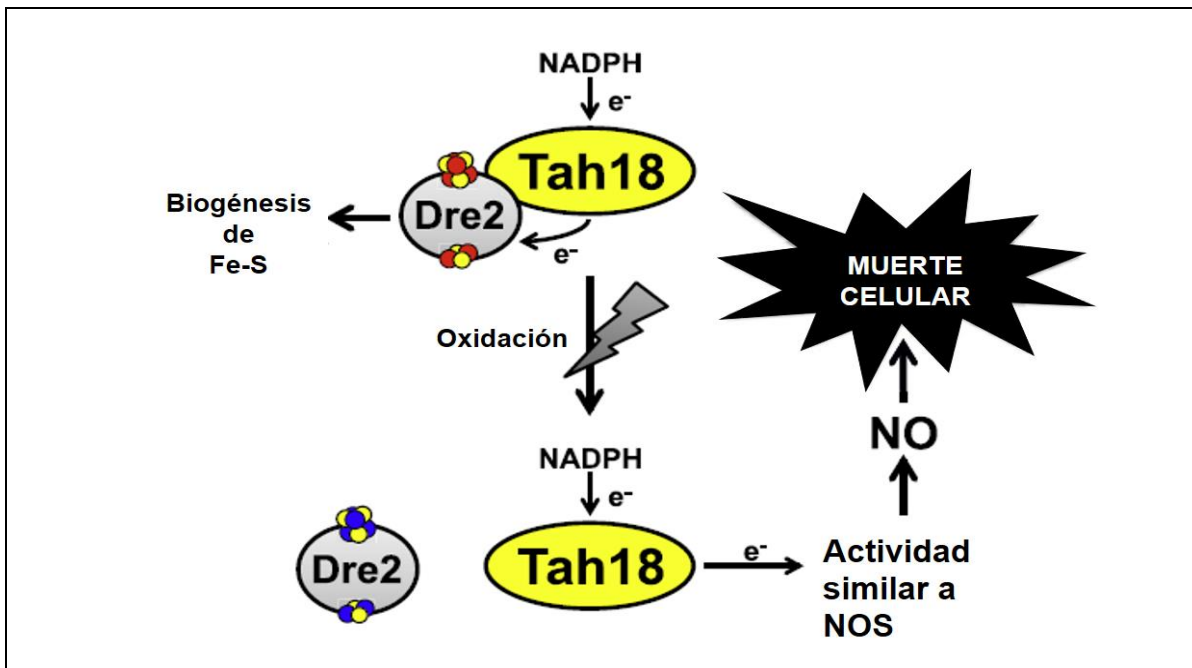


Figura 1.5 Modelo propuesto para la regulación de la muerte celular por una enzima que actúa como NOS en *S. cerevisiae*. *Tah18* y *Dre2* están unidos en el citosol en una etapa temprana de la biogénesis de clusters de Fe-S; cuando el ambiente cambia a uno oxidante como el tratamiento con H_2O_2 , el complejo *Tah18-Dre2* se disocia, *Tah18* tiene actividad de NOSintasa, utilizando *NADPH* como fuente de electrones para producir NO y promover la muerte celular. Tomada y modificada de: Yoshikawa *et al.*, 2016.

1.4 Nitrosilación como resultado del estrés nitroso

El NO genera dos tipos de modificaciones postraduccionales que se conocen comúnmente como nitrosilación y nitrosación e interesantemente predominan cuando la proteína tiene una estructura secundaria. Estos cambios bioquímicos se llevan a cabo por tres modos de acción a través de tres diferentes especies de NO. Para la nitrosilación, el ambiente reductor es propicio para que haya una conjugación directa de NO-Fe²⁺, aumentando su electronegatividad y reaccionando con el tiol de cisteína; mientras que la nitrosación el catión NO⁺ realiza directamente un ataque nucleofílico en el grupo tiol y, de hecho, es aún más afín con el grupo tiolato, para así generar S-Nitrosatiol (RSNO). Adicionalmente el anión de NO⁻ puede conjugarse con O₂ para formar NO₂ y efectuar un cambio en residuos de tirosina (Stamler *et al.*, 1992; Hess *et al.*, 2005; Bindu y Solomon, 2015). Ahora bien, estas identidades moleculares basadas en NO modifican los residuos de cisteína con efectos fisiopatológicos que van desde disfunciones mitocondriales en la cadena transportadora de electrones, disfunciones cardíacas (isquemia), cardioprotección, neuromodulación de procesos de senescencia, catabólicos y de síntesis relacionados con la neurotransmisión; así como también la disfunción neuromuscular y el deterioro cognitivo (Suzuki *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2009; Okamoto *et al.*, 2014; Chouchani *et al.*, 2017; Montagna *et al.*, 2020). Otro de los mecanismos moleculares más relevantes de la nitrosilación es la regulación de la actividad del factor transcripcional de OxyR, poco después se hallaría que una proteína de agrupación híbrida (Hcp en inglés) conjunto del regulón OxyR-SNO es capaz de actuar como nitrosilasa debido a su cluster de hierro en *E. coli* (Seth *et al.*, 2012; Seth *et al.*, 2018). Actualmente, el mecanismo molecular más sorprendente de la S-nitrosilación se observó en la señalización interespecie de las relaciones simbióticas como el microbiota residente que puede producir NO y dar forma al paisaje postraduccionales de proteínas S-nitrosiladas en su hospedero para regular el microARN, el ARNm y la expresión génica en el desarrollo de *C. elegans* (Seth *et al.*, 2019). Existe otro grupo de genes de enzimas que se encargan de regular la

toxicidad por NO (Figura 1.6), son genes complementarios que codifican productos bi-funcionales, como: flavohemoglobinas (*YHB1*), nitrosoglutatión reductasa (*GSNOR*), desoxigenasas (*SFA1*) que utilizan factores de regulación alostérica y funcional a NADPH, además de reducir al glutatión, se presume que su regulación puede ser a través de modificaciones postraduccionales (Astuti *et al.*, 2016). Si bien este péptido es vital para soportar la toxicidad de los radicales libres en el estrés oxidativo se ha demostrado que también se reduce con grupos NO, formando el GSNO que sirve como reservorio y mantenimiento en la homeostasis celular. También existen otro tipo de desoxigenasas que reducen la coenzima A nitrosilada (SNOCoA), a una amina terminal, dependiente de NADPH. Mostrando otro mecanismo de regulación de especies reactivas de nitrógeno (RNS) por otras vías alternas parecidas a la función antioxidante del glutatión, mientras que CoA puede fungir como fuente de grupos NO para la S-nitrosilación de proteínas. A fin de que el óxido nítrico como lo mencionamos anteriormente sea catalizado por alguna proteína con dominios de iones metálicos y reguladas alostéricamente por Ca^{2+} , Mg^{2+} y O_2 /reducido), así es más probable que el tiol de la cisteína sufra un ataque nucleofílico de moléculas electrofílicas como el NO^+ (Anand *et al.*, 2014; Björck *et al.*, 2017; Cassanova *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2000).

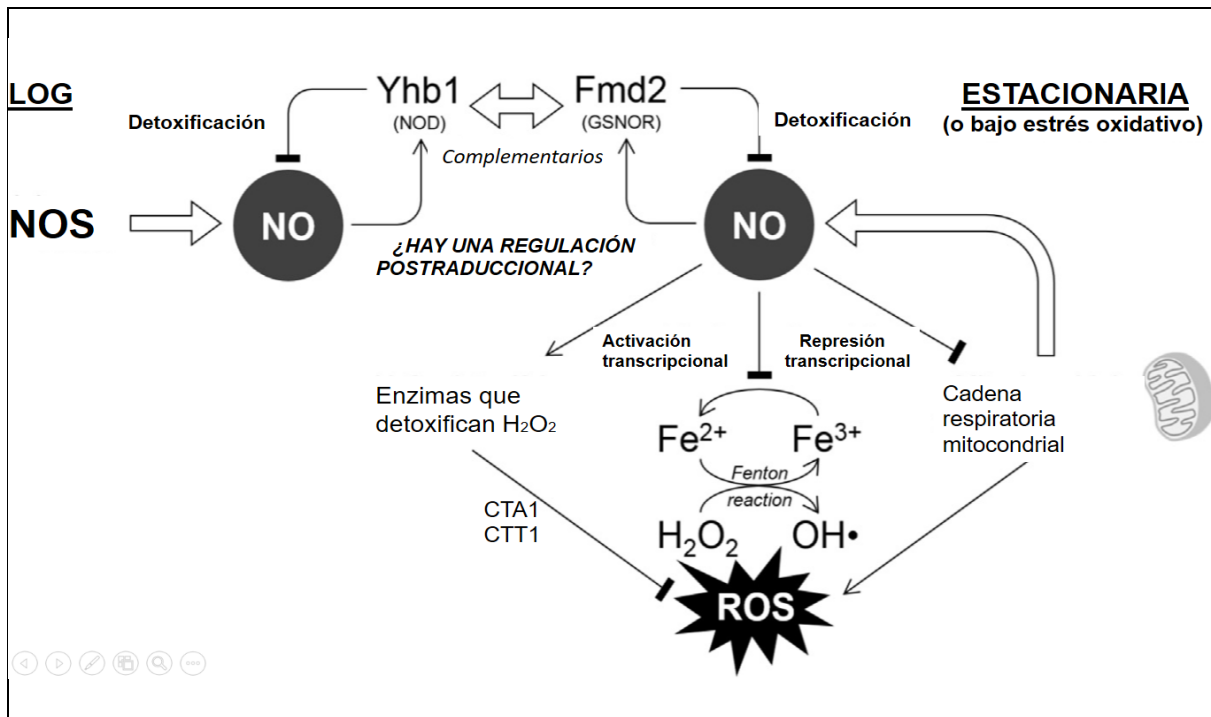


Figura 1.6 Modelo propuesto para la homeostasis del NO y su regulación en el estrés oxidativo. *YHB1* y *GSNOR* (*Fmd2*) son dos enzimas que ayudan a la desintoxicación del NO y son complementarias cuando la otra no está, posiblemente sean reguladas postraduccionalmente en las diferentes fases. El NO tiene tres mecanismos antioxidantes: 1) activando la transcripción de catalasas (*CTA1* y *CTT1*) las cuales degradan H₂O₂; 2) inhibiendo la transcripción de genes de CRM; 3) inhibiendo la conversión de Fe³⁺ a Fe²⁺. Tomada y modificada de: Astuti *et al.*, 2016.

1.5 Biología del estrés oxidativo y ROS

El estrés oxidativo es el resultado de la entropía de la tasa metabólica del organismo. En otras palabras, las moléculas oxidantes se generan como parte del metabolismo de procesos biológicos y patológicos de la célula. La generación de especies reactivas es parte inevitable de la vida, una causa molecular factible es propuesta por D. Harman, (1956) quien relacionó la tasa metabólica de enzimas de la respiración celular y el incremento de especies reactivas de oxígeno. En consecuencia, el aumento de la tasa metabólica promoverá la formación de ROS, y su acumulación es perjudicial para el mantenimiento de la estructura-función de otras macromoléculas de la célula. Como resultado de la enorme base científica, en los últimos años se estableció la teoría del envejecimiento por radicales libres

(FRTA, en inglés), la cual se ha aceptado en su totalidad en la comunidad científica (Schmeisser y Ristow, 2011).

En *Saccharomyces* las catalasas están involucradas en la tolerancia a oxiradicales (O_2^-), hidroxiradicales ($OH\cdot$) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2 .) Anteriormente, ya había sido reportado por Izawa y col. en 1996, que las mutantes deficientes en catalasas son sensibles al estrés oxidativo por H_2O_2 . Existen dos formas de esta enzima, la primera se conoce como catalasa A (*CTA1*) y se localiza en peroxisomas; la segunda se conoce como catalasa T y se distribuye por todo el citosol. Esta última es la determinante para la tolerancia a la radiación ionizante y oxidación por H_2O_2 (Nishimoto *et al.*, 2015; Nishimoto *et al.*, 2016).

1.6 Sulfenilación como producto de la oxidación de ROS

La S-sulfenilación es otra modificación que es paralela a la nitrosilación, ya que ésta se genera en un ambiente celular oxidativo: ocasionado por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) especialmente el H_2O_2 , los cuales se conjugan una o más veces para reaccionar con el tiol de la cisteína, formando grupos proteicos de ácidos sulfénicos $-SOH$ o enlaces disulfuro. Mientras aumenta el estado oxidativo celular y se conjugan más ROS, el tiol se oxida aún más hasta ser irreversible, formando grupos de ácidos sulfínicos/sulfónicos; así que representa un estrés oxidativo prolongado. Como bien sabemos el sustrato para esta modificación (H_2O_2) se genera como desecho de la vía de la respiración celular y también es el resultado final de la peroxidación de ácidos grasos. Justo como en el caso del RSNO, la $-SOH$ señala y modifica funcionalmente proteínas, también pueden interaccionar con NO y otras proteínas que lo modulan tioredoxinas (*TRX*), glutaredoxinas (*GRX*) y dismutasas (*SOD*) (Figura 1.7) (Bindu y Solomon, 2015; Chung *et al.*, 2013; Gould *et al.*, 2016).

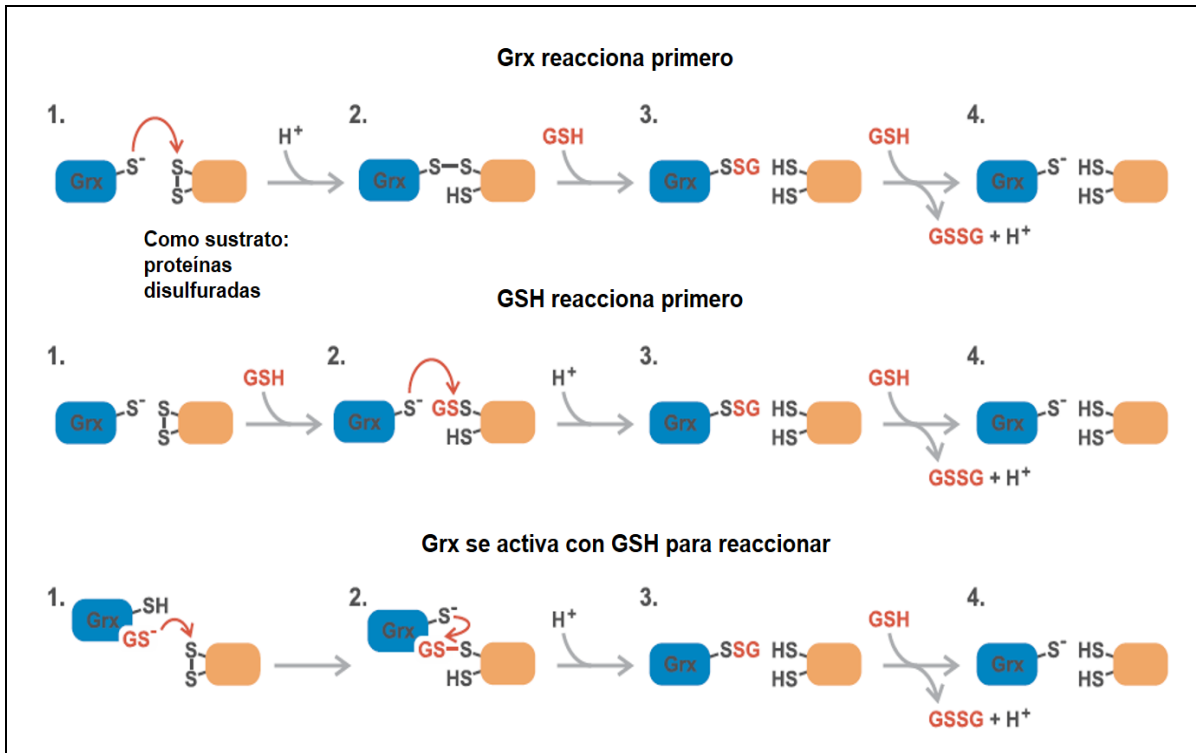


Figura 1.7 Tres diferentes vías en las que trabajan las glutaredoxinas monotiólicas con glutatión. 1) *Grx* reacciona primero con el disulfuro de la proteína. 2) Primero se glutatona el disulfuro proteico y después *Grx* reduce el tiol. 3) Hay una previa configuración alostérica de GSH para *Grx*, activando su reacción hacia el disulfuro. Tomada y modificada de: Zimmermann *et al.*, 2020.

1.7 Crosstalk de gasotransmisores: NO y H₂S

El H₂S fue el último gasotransmisor reconocido junto con CO y NO. Así como los S-nitrosotioles el H₂S tiene similitudes en los efectos fisiológicos al modificar el tiol; de igual manera sus blancos son similares incluyendo a *GAPDH*, albumina, actina, *ADH1*, *AST*, mioglobinas, tioredoxinas, catalasas y proteínas con grupo metálico (Zhao *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2012; Marozkina y Gastón, 2020). Además, ambos activan centinelas importantes y comparten vías de señalización que involucran a *cGMP*, cinasas y fosfodiesterasas (Bucci *et al.*, 2010, 2012; Marozkina y Gastón, 2020). Sin embargo, la interacción más contundente e importante se observó con Miyamoto y col. en 2017 cuando demuestran la generación de polisulfuros a través de sulfuro y óxido nítrico, que a su vez activaban canales *TRPA1* (Figura 1.8).

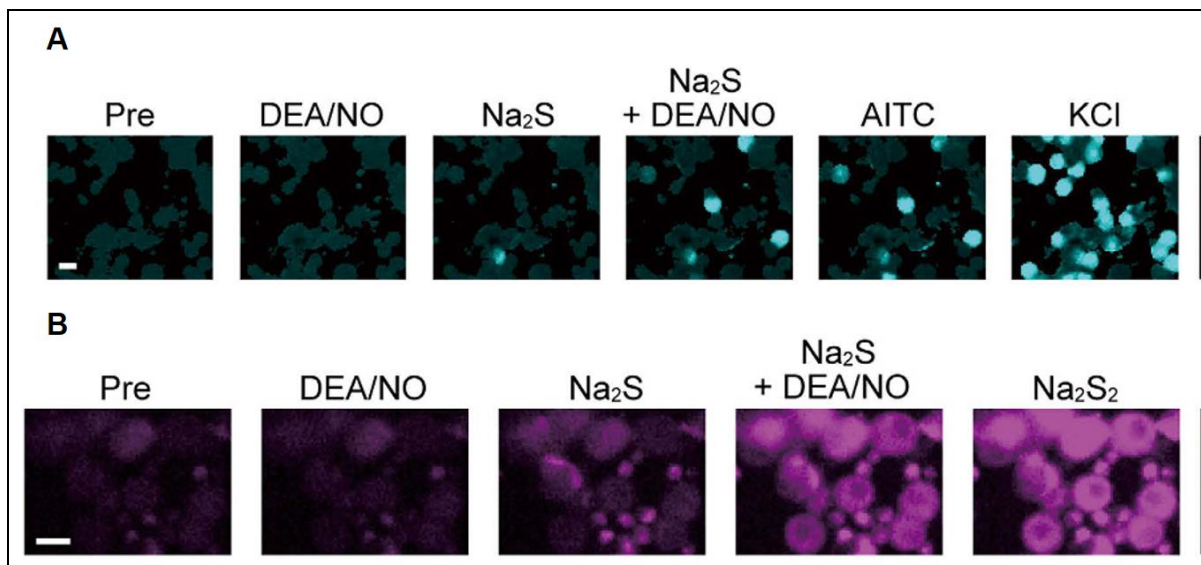


Figura 1.8 Generación de H_2S_2 y H_2S_3 por la interacción de NO- H_2S y efecto en los canales *TRPA1*. A) Activación del canal *TRPA1* de la interacción Na_2S + DEA/NO. Imágenes del flujo de Ca^{2+} se examinó la activación de *TRPA1* con un molécula sensible y fluorescente, Flou-4, utilizando como control positivo su agonista isotiocianato de alilo (AITC) y KCl. B) H_2S_2 y H_2S_3 son formados en neuronas (DRG) producto de la interacción de NO y H_2S , que es comparable a la señal del donador Na_2S_2 , evidenciando la activación de *TRPA1* por polisulfuros (H_2S_n). Analizado por una sonda fluorescente, específica y reversible al sulfuro del tiol (SSip-1). Tomada y modificada de: Miyamoto *et al.*, 2017.

Abe y Kimura fueron de los primeros investigadores en trabajar en la fisiología del sulfuro, encontrando sus primeros roles en la modulación sináptica y neuroprotección (Abe y Kimura, 1998; Kimura *et al.*, 2005). Era de suponer que el primer “crosstalk” identificado en un proceso fisiológico tan claro como la vasodilatación por Hideo Kimura y col. en 1997 hallaron el efecto sinérgico de NO y H_2S en la relajación del músculo liso. Después Whiteman y col. en 2006 propusieron que diferentes donadores de nitrosotiol en reacción con H_2S podrían generar un nuevo intermediario un poco menos estable que el nitrosotiol, lo llamarán ácido tionitroso (HSNO). Más tarde Filipovic y col. en 2012 confirmarían la existencia del HSNO en condiciones fisiológicas demostrando que a partir de éste se pueden generar otros nitrosotioles y HS. El mismo grupo de investigación, en el mismo año, evidenciaron que la constante de velocidad correspondiente a la reacción del peroxinitrito con H_2S es mayor que con otros tioles como la cisteína y glutatión, en condiciones fisiológicas relevantes; de este modo, un nuevo producto se formaría $HSNO_2$ (tionitrato), predominantemente presente como nitrito de

sulfinilo HS(O)NO que bien puede ser un buen donante de NO. La característica bioquímica más relevante de estas nuevas identidades moleculares es que son el resultado de la protección del sulfuro contra los efectos del peroxinitrito, suprimiendo sus propiedades proapoptóticas, oxidativas y nitrativas (Filipovic *et al.*, 2012). Un año más tarde encontraron que porfirinas con grupos Fe pueden tener actividad nitrito reductasa para formar óxido nítrico y el correspondiente ácido sulfénico; y que en presencia de un donador de protones podría formar nitroxil (HNO) (Figura 1.8) (Milijkovic *et al.*, 2013). Eberhardt y col. (2014) observaron que HNO es el principal intermediario del H₂S y NO, el cual estimula el receptor *TRPA* para formar el complejo HNO-*TRPA1*-CGRP y constituir la vía esencial de señalización del control vascular (Figura 1.9).

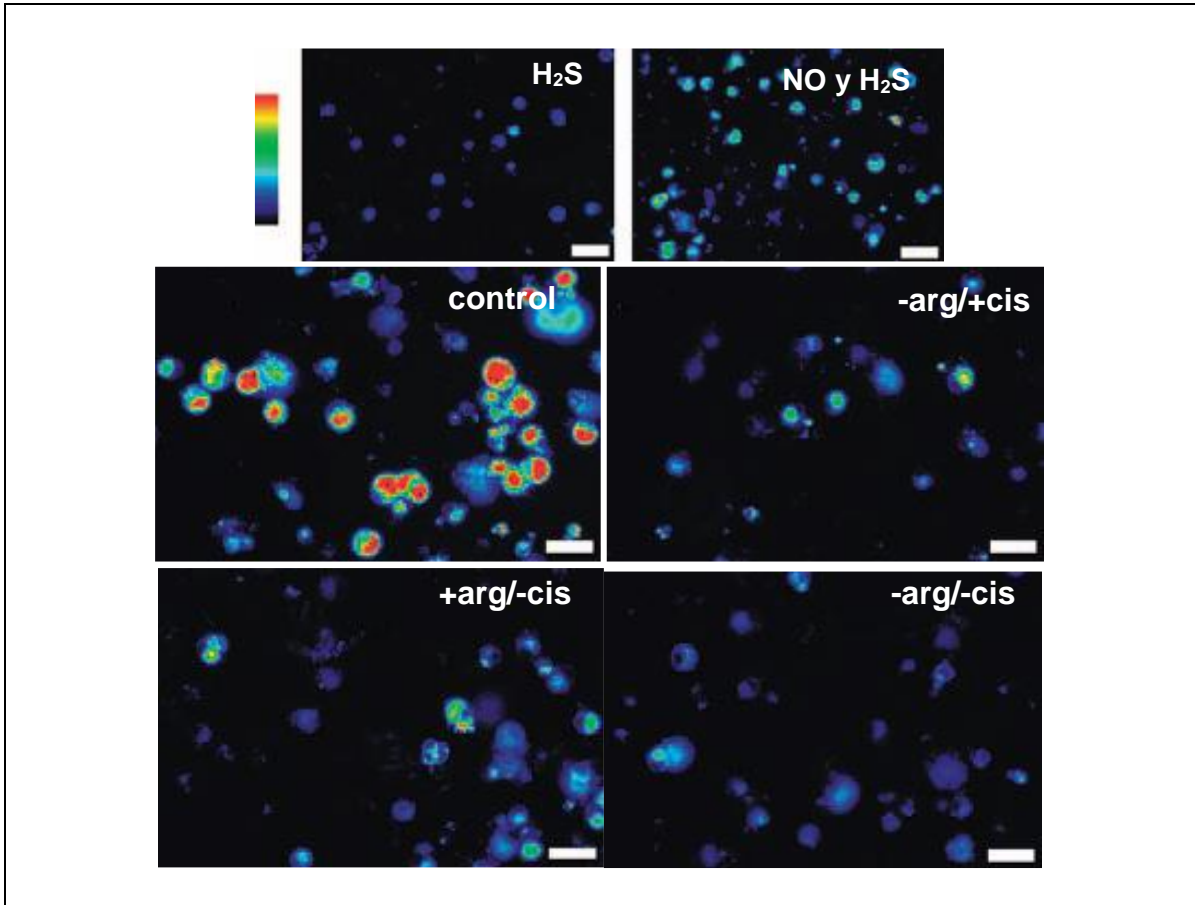


Figura 1.9 Formación de HNO es dependiente de H₂S y NO. Florescencia en las neuronas de la raíz dorsal (DRG) con la presencia de Nitroxil (HNO) incubado con cuBOT1, molécula sensible para su detección. Células con el donador de H₂S no se observa fluorescencia basal indicando que sólo con la interacción con NO, se puede apreciar una señal basal de HNO. También la fluorescencia basal se redujo en aquellas neuronas en las que se agotó el aminoácido: arginina o cisteína, sustratos importantes para la producción de NO y H₂S. Tomada y modificada de: Eberhardt *et al.*, 2014.

Originalmente se sabía que la delección de la cistationina gamma-liasa (*CSE*) previene de los efectos vasodilatadores de acetilcolina y NO (Coletta *et al.*, 2012). Poco después, King y col. (2014) demostraron la señalización cito protectora de *CSE*, responsable de la producción del persulfuro de hidrógeno los cuales regulan positivamente la activación de eNOS para la producción de NO contra el estrés oxidativo y la lesión por isquemia. Por otro lado, Altaany y col. (2014) describen el mecanismo que subyace el origen de la producción de NO y H₂S a través de la señalización de tres modificaciones postraduccionales: *CSE* persulfura a eNOS para su dimerización de modo que pueda fosforilarse para producir NO, y al mismo tiempo por nitrosación se inhibe eNOS (Figura 1.10). Sin embargo, Sziórtó

y col. en 2018 probaron todo lo contrario: cuando se muta CSE no hay una disminución de los niveles de NO, sólo disminuye la interacción química directa para generar nitroxil que es adoptado como el personaje principal de la respuesta vasodilatadora del endotelio y la regulación sistémica de la presión sanguínea (Figura 1.11).

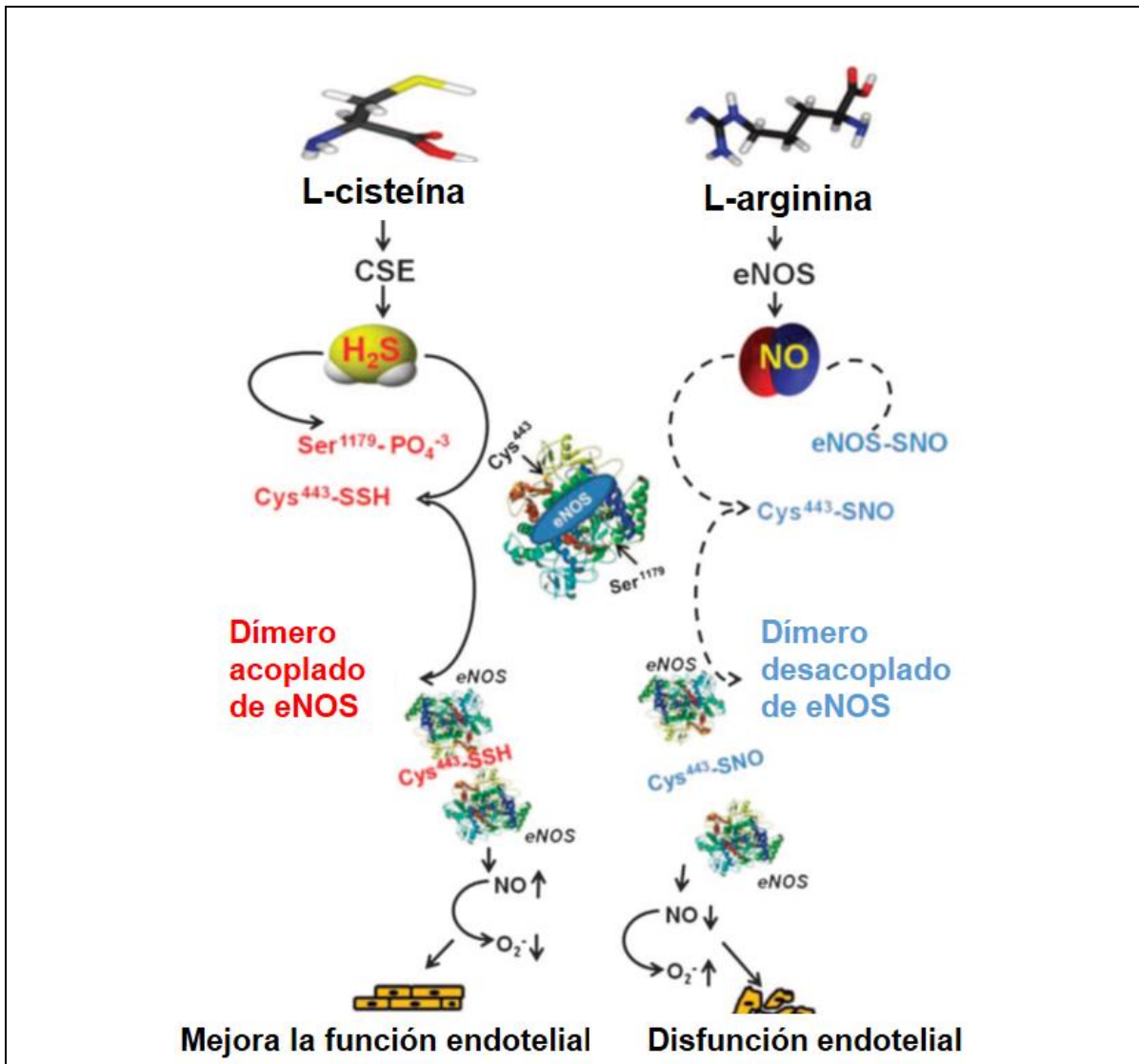


Figura 1.10 Esquemización de la interacción por NO y H₂S. eNOS produce NO a partir de L-arginina lo que genera la nitrosilación de esta misma en varias cisteínas, como resultado se desacoplan los dímeros funcionales de eNOS reduciendo el NO y aumentando la biodisponibilidad de oxígeno e impactando en la disfunción endotelial. El H₂S generado a partir de L-cisteína, modifica por persulfuración el residuo 443 de cisteína generando el dímero funcional para posteriormente fosforilar a eNOS llevando a la producción de NO y disminución del O₂⁻ en las células endoteliales. Tomada y modificada de Altaany *et al.*, 2014.

Para finalizar, en condiciones fisiológicas se genera una red de reacciones químicas en cascada que producen radicales intermedios de la interacción química de NO y H₂S. En general, se acumulan tres productos principales: nitropersulfuro (SSNO), el cual es resistente al ataque nucleofílico de tioles y a la cianólisis, dona de manera eficiente tanto sulfuro como NO y baja la presión arterial; Polisulfuros (H₂S_n) resultado de conjugaciones tanto de productos intermedios como de productos de síntesis/descomposición de SSNO⁻, también disminuye la presión sanguínea y mejoran la distensibilidad arterial; y dinitrosulfito (SULFI/NO) un donante débil combinado de NO/nitroxilo que libera principalmente N₂O cuando se descompone; aunque afecta la presión arterial levemente, aumenta notablemente la contractilidad cardíaca (Cortese-Krott *et al.*, 2015).

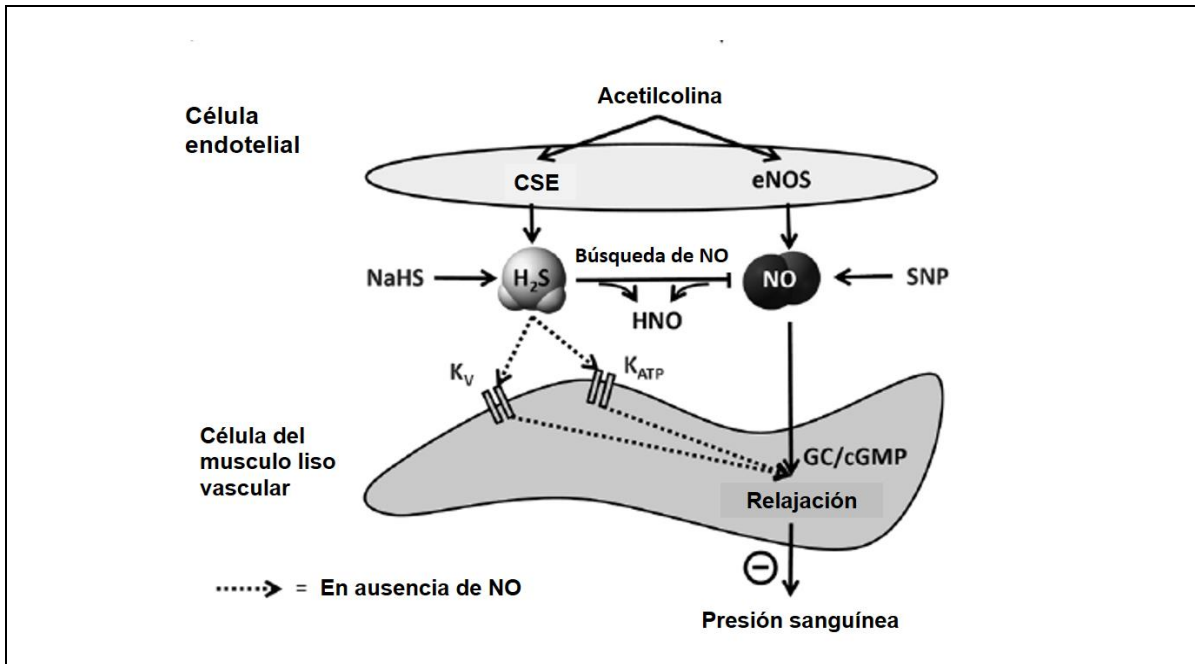


Figura 1.11 Relajaciones inducidas por Acetilcolina (ACh) de células endoteliales del músculo liso de arterias mesentéricas. ACh estimula las sintasas *CSE* y *eNOS* para producir HNO, colocándose como un potente vasodilatador por ser el regulador maestro de las cascadas señalización de *cGMP/cAMP*. En ausencia de *eNOS*, H₂S puede producir relajaciones en dos canales (K_v y K_{ATP}), pero no son significativas. Sin *CSE* se limita la biodisponibilidad de NO y se inhibe el efecto vasodilatador de HNO. Tomada y modificada de Szijártó *et al.*, 2018

1.8 Crosstalk de gasotransmisores: H₂S y H₂O₂

Como ya habíamos visto antes, la acción del persulfuro y más concretamente, la persulfuración de cisteína (PSSH), ha demostrado ser una modificación que protege de la oxidación de cisteína y se propone como la primera línea de defensa contra la hiperoxidación. Por su tamaño, su fácil difusión y el flujo de abundancia la hace el candidato perfecto para reaccionar con el tiol de la cisteína y fungir como un nucleófilo más atractivo para las especies reactivas y H₂O₂ (Cuesanta *et al.*, 2012; Filipovic *et al.*, 2018). Sin mencionar que el enlace disulfuro que se genera puede ser renovado por el sistema de tiorredoxinas, que acompañado de glutarredoxinas son la maquinaria complementaria ideal para mantener tioles reducidos usando glutatión como tiol de reserva y agente reductor (Figura 1.7) (Zimmerman *et al.*, 2020). Cuando se envejece, la acumulación de ROS que deriva en estrés oxidativo es la causa principal de los efectos de crecer, y más

allá, la pérdida de niveles de persulfuración y del decremento en expresión de enzimas que producen ese persulfuro (Figura 1.12), es una evidencia clara que demuestra la relación directa del incremento de la edad y la pérdida de protección del persulfuro junto a la acumulación de MPox irreversibles (Zivanovic *et al.*, 2019).

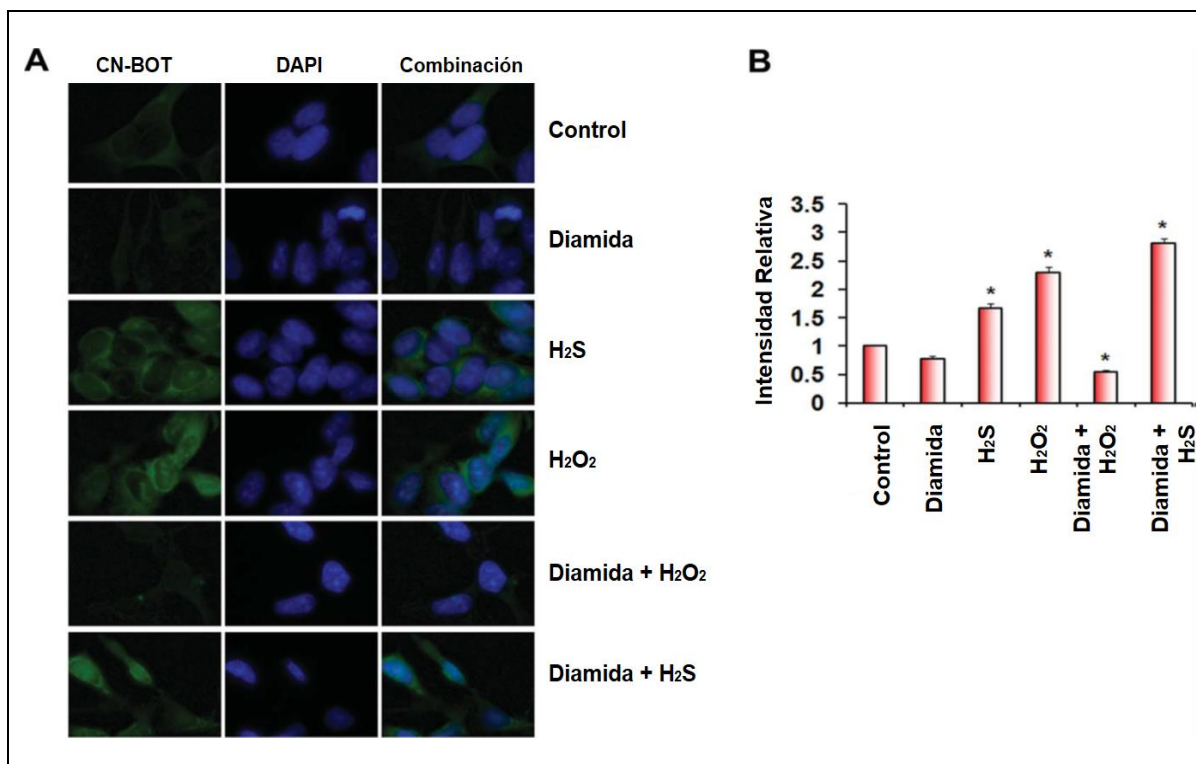


Figura 1.12 Afinidad de H₂S para reaccionar con ácidos sulfénicos, pero no con disulfuros: mecanismo base de la persulfuración intracelular. La incubación de células del neuroblastoma SH-SY5Y con la etiqueta fluorescente de persulfuros CN-BOT, no incrementó la persulfuración con el tratamiento de la oxidante diamida, mientras que con el tratamiento de H₂O₂ llevó a un gran aumento de señal casi como en el control positivo en el que se usó Na₂S. Tomada y modificada de: Wedmann *et al.*, 2016

Más recientemente, se ha encontrado que el tior de cisteína y H₂S tienen el mismo número de oxidación y para generar una persulfuración o de una manera más técnica una sulfhidratación, debe haber una previa oxidación de cisteína y/o polisulfuros que al conjugarse generan nucleófilos que reaccionan fácilmente con radicales libres, lo que lleva a la oxidación escalonada de los grupos persulfuro, formando: ácido pertiosulfénico, ácido pertiosulfínico y ácido pertiosulfónico, y difieren de las especies hiperoxidadas como el ácido sulfénico, sulfínico y

sulfónico por el hecho de tener un enlace disulfuro intrínseco que lo hace reversible (Figura 1.13) (Dóka *et al.*, 2020). Para finalizar, la mayoría de estos mecanismos y efectos fisiológicos de estas modificaciones se conocen en mamíferos y en la mayoría de los casos usando donadores externos que no necesariamente recapitulan el ambiente celular como lo haría una mutante que lo acumule, teniendo en cuenta que no es clara la señalización de estos gasotransmisores en hongos unicelulares y en muchos otros organismos de interés, lo que aportaría evidencia fisiológica de estas moléculas que puede ser conservada por la cercanía evolutiva del linaje Eucarya.

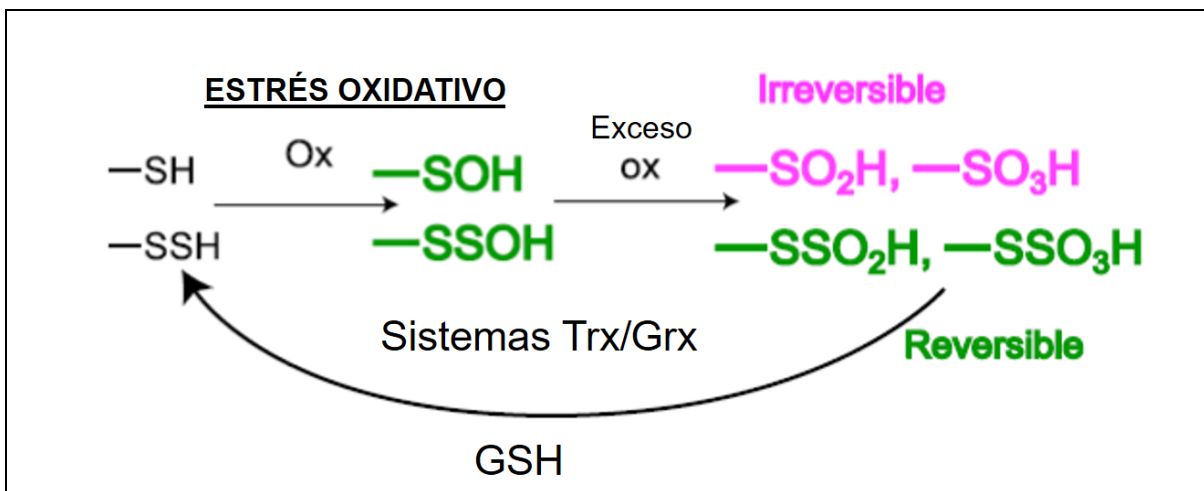


Figura 1.13 Rol fisiológico hipotético para los sistemas de tiorredoxinas y glutarredoxinas (Trx/Grx). Pueden reducir especies de persulfuros súper-oxidados que son reversibles (en verde) pero no de especies de tioles súper-oxidados los cuales son irreversibles (en magenta). Tomada y modificada de Dóka *et al.*, 2020.

2. JUSTIFICACIÓN

Las modificaciones postraduccionales cambian la estructura y función de proteínas, su estudio nos ayudaría a establecer un panorama general de los patrones estructurales que surgen y que conllevan a otras dinámicas funcionales específicas. Es necesario para saber *per se* el significado y el efecto bioquímico de cada una, ya que las variaciones de las respuestas funcionales son intrincadas por la interacción con otros gasotransmisores, el ambiente estequiométrico y el contexto fisiológico-genético que desencadena vías de señalización.

La mayoría de los estudios enfocados en la fisiología de gasotransmisores se estudian *in vitro* y con la estimulación exógena de un donador que no necesariamente recapitula el ambiente celular; aquí buscamos generar modelos genéticos aptos para su estudio. Por otro lado, el dilucidar estos mecanismos postraduccionales conservados evolutivamente, que señalizan la activación de múltiples redes de genes, y que en forma general aún no se esclarece su significado biológico y por tanto evolutivo. Para terminar, es importante mencionar que tanto las proteínas que sintetizan como las que degradan estos gasotransmisores son los personajes principales que catalizan las reacciones para traspasar el grupo molecular a una cisteína blanco. El estudiar en conjunto el paisaje de modificaciones ayudaría a tener una comprensión más amplia de los procesos reguladores de la célula en el estrés.

3. HIPOTESIS

La cepa $\Delta yhb1, \Delta sfa1$ producirá un exceso de RNS y por ende más acumulación de señal de proteínas S-nitrosiladas y S-sulfeniladas. Por otra parte, la cepa $\Delta cta1, \Delta ctt1$ acumulará un exceso de ROS y tendrá un paisaje proteómico con más S-sulfenilación. Por último, la S-persulfuración de proteínas tendrá presencia en ambas cepas por la acumulación de RNS

4. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la dinámica de modificaciones postraduccionales (SOH y SSH) en los residuos de cisteína en mutantes dobles que acumulan H_2O_2 y NO.

4.1 Objetivos Particulares

- Construir cepas mutantes de los genes *YGR234W (YHB1)*, *YDL168W (SFA1)*, *YDR256C (CTA1)* Y *YGR088W (CTT1)*.
- Construir cepas dobles mutantes que acumulen RNS y ROS.
- Extracción y marcaje de proteínas sulfeniladas y persulfuradas.
- Identificación de proteínas modificadas por Western Blotting.

5. MATERIAL Y MÉTODO.

Medio YPD líquido

Extracto de levadura 1%, Bacto peptona 2%, Dextrosa 2%

Medio YPD sólido

Extracto de levadura 1%, Bacto peptona 2%, Dextrosa 2%, Agar 2%

Medio YP Glicerol Sólido

Extracto de levadura 1%, Bacto peptona 2%, Glicerol 2%, Agar 2%

Buffer de corrida SDS-PAGE 10X

Tris 250 mM, Glicina 1.92M, SDS 1%, pH 8.3

Buffer de transferencia 1X

Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%, pH 8.3

Buffer de Lisis

Tris 50mM pH 7.5, EDTA 1 mM, NaCl 150mM, SDS 0.5%

Buffer de Lisis HEN

Hepes 250mM, EDTA 1mM, Tritón 1%, NaCl 150mM, Neucoprina 100µM, Deferoxamina 100µM. pH 7.7

Inhibidor de Proteasas

PSMF 1mM, Cocktail 1X

TBS 10X pH 7.6

Tris-HCl 24.2 g/L, NaCl 80.06 g/L

TBS-Tween 1X (TBS-T)

TBS 1X, Tween 0.05%

Antibióticos

G418 [200 µg/ml].

Higromicina B [250 µg/ml]

Clonat [100 µg/ml].

5.1 Plásmidos

Se utilizaron tres plásmidos como moldes de amplificación por PCR para aumentar las probabilidades de delección (Esquema de la estructura de los plásmidos 10. Anexo). También verificamos si la transformación integrativa del respectivo fragmento fue correcta, por selección de mutantes resistentes a diferentes antibióticos.

Plásmido pAG32 que contiene el gen *hphMX4* de *Klebsiella pneumoniae* que codifica la higromicina B fosfotransferasa y confiere resistencia al antibiótico higromicina B de levaduras transformadas.

Plásmido pAG25 que confiere resistencia a “CloNAT” ó nourseotricina, ya que contiene el gen *nat1* de *Streptomyces noursei* y por tanto la enzima N-acetiltransferasa.

Plásmido pUG6, flanqueado por loxP: loxP-pAgTEF1-kanMX-tAgTEF1-loxP que contiene el gen *kanMX* dando resistencia al nuevo fenotipo al antibiótico G418.

5.2 Oligonucleótidos

Tabla 5.1 Oligonucleótidos diseñados a partir del programa *Serial-Cloner* versión 2.6

Gen	Hibridación con plásmido	
	Forward	Reverse
<i>YHB1</i>	TTGTTCAATTTTTACCATTTTCAACA AACCACACAAAGACTTTATTCATTca gctgaagcttcgtacgc	AAATTATCAAATGAATCAGTAATAAAATTGAAGT TTCCGAGGCTTAACGCcataggccactagtgatc
<i>SFA1</i>	ACTTCTACAAAATCTCCAAGTAAAG AAGGAATATAAGTAATATAAGTACA cagctgaagcttcgtacgc	AAGTATTCCAGAAAATTTGAGTCATGCTTACTTA GTTTAATTAAGTACTCcataggccactagtgatc
<i>CTT1</i>	AAATCCTTCTCTTGTCTCATGCCAA TAAGATCAATCAGCTCAGCTTCACA cagctgaagcttcgtacgc	AATAATTATGGAGATATAATTACGAATAATTATG AATAAATAGTGCTGCCcataggccactagtgatc
<i>CTA1</i>	AAGTTAAATAAATATAATAGTACTTA CAAATAAATTTGGAACCCTAGAAGc agctgaagcttcgtacgc	CATAAATAATTGTCTGGAAACAACGCCACTCA TTTGTTACTTGAGCGTTcataggccactagtgatc
	Oligonucleótidos de confirmación	
	Confirmación A	Confirmación D
$\Delta yhb1$	ACTAAAATAGCGGACGCGC	TGTTTAGCACCTGGCGCTT
$\Delta sfa1$	CAGAATTTGTTGGCCTATT	CAATACGTTGGTAGTTAGG
$\Delta ctt1$	CAGAAGGGTTATTATTGTC	AATGCGATAATCGTTGAGT
$\Delta cta1$	CTAACCACTATTTAAAGCC	TCAGACATCGTTTCTTGGT
<i>TEF-1PromTest</i>	CGGCGTGGGGACAATTCAA	

5.3 Uso de Bases de Datos

STRING

Se utilizó la base de datos <https://string-db.org/> para identificar las interacciones físicas y funcionales de los genes y sus productos proteicos.

5.4 Generación de mutantes en *S. cerevisiae*

Se utilizó el simulador *Serial-Cloner* versión 2.6, un software de biología molecular que proporciona diferentes herramientas con interfaz intuitiva para la clonación de ADN, análisis de secuencia y visualización.

Para realizar mutantes sencillas se utilizaron tres vectores diferentes: puG6, pAG32 y pAG25; con el fin de aumentar nuestras probabilidades de éxito en la transformación de cepas competentes de *S. cerevisiae* con fondo génico BY4742 α . La delección individual de los genes *YHB1*, *SFA1*, *CTA1* y *CTT1* se llevó a cabo por un evento de doble recombinación. Primero, para cada gen se formaron oligonucleótidos *forward* y *reverse*, tomando la secuencia completa de cada gen con 50 pb antes (rio arriba) y 50 pb después del ORF (rio abajo) de la base de datos *Sacharomyces Genome Database* (SGD), después se hibridaron con 19 pb homólogas a los plásmidos usados mediante un PCR *in silico* teniendo como templado el plásmido deseado con el fin de tener visualización del tamaño de los fragmentos resultantes. Por último, mediante PCR de punto final se logró la amplificación e hibridación del plásmido con los oligonucleótidos *forward* y *reverse*.

Para finalizar, por efecto de estrés térmico transformamos a nuestras células competentes de levadura silvestre con el primer producto PCR que contenía el plásmido hibridado, por efecto de la recombinación homóloga en las regiones rio arriba y debajo que delimitan cada gen, flanqueamos e integramos nuestro vector genético que contiene nuestro casete de resistencia con un gen marcador de selección en la región del gen blanco. En la Figura 5.1 se ilustra cómo se materializó la eliminación de un gen.

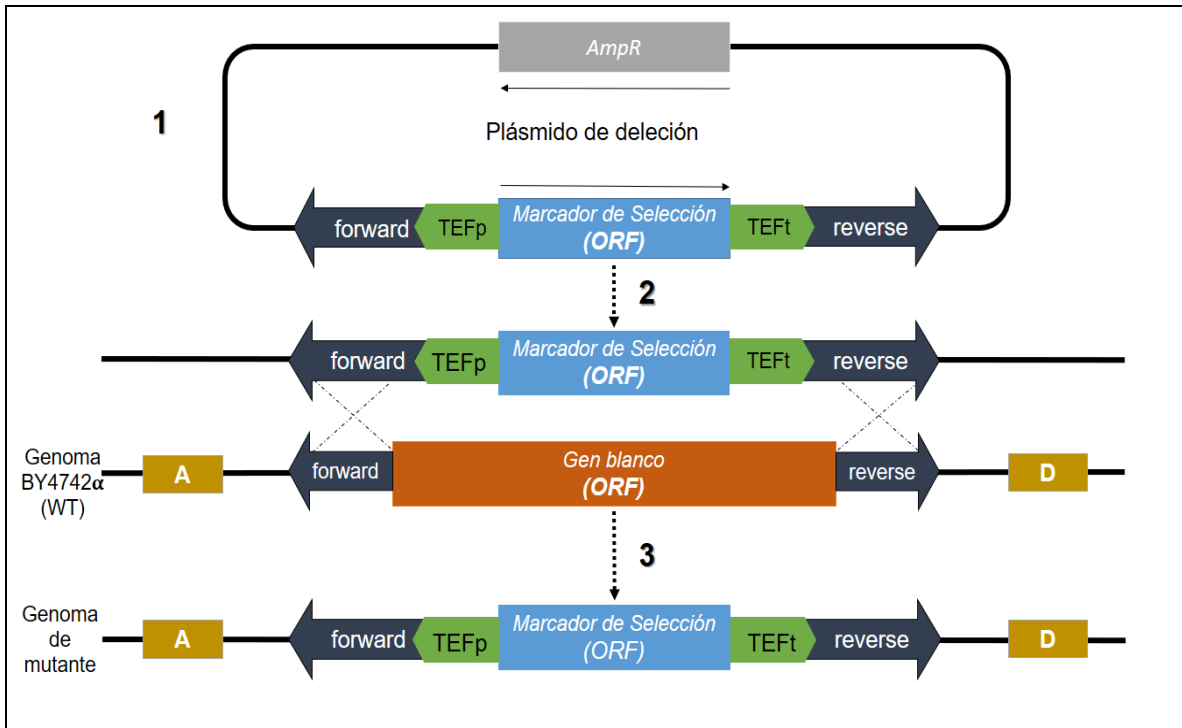


Figura 5.1 Esquema del proceso de delección de un gen en Levadura. 1) Los tres plásmidos utilizados cuentan con una estructura similar: marcador de selección que codifica algún gen de resistencia y se limita por la región promotora (TEFp) y terminador (TEft). En primera instancia se realiza un PCR para integrar los oligonucleótidos “forward” y “reverse” que son homólogos antes y después de la ORF del gen blanco, respectivamente. 2) La transformación de células competentes (*BY4742α*) por medio de un evento de doble recombinación gracias a la homología de 19 pb de las regiones grises que corresponden a forward y reverse. 3) Se integra al genoma el gen marcador limitado por las regiones A-D, utilizados como zonda para la confirmación de una cepa mutante.

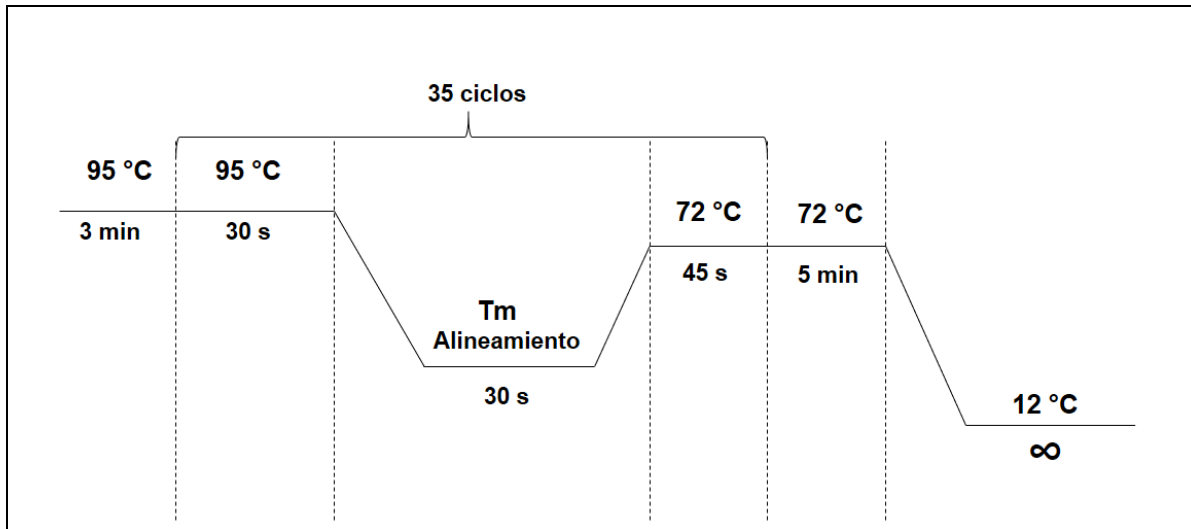


Figura 5.2 Programa para amplificación utilizado para generar productos de PCR con oligonucleótidos *Forward* y *Reverse* para hibridar con plásmidos.

5.5 Construcción de cepas dobles mutantes: $\Delta yhb1$, $\Delta sfa1$ y $\Delta cta1, \Delta ctt1$

5.5.1 PCR para hibridar plásmido con oligonucleótidos *Forward* y *Reverse*

Tres plásmidos se usaron como templados génicos (pAG25, pAG32 y pUG6) los cuales se amplificaron por PCR junto con los oligonucleótidos *forward* y *reverse* 0.5 μ L, dNTP's [10mM] 0.4 μ L, Buffer Ffusion HF 1x, DNA polimerasa *Phusion High-Fidelity* (Thermo Scientific) 0.02 U/ μ L, ADN molde 5 μ L [1 ng/ μ L] y 13.6 μ L de agua para tener un volumen final de 20 μ L. Se utilizó el programa de temperaturas que dicta el fabricante para ADN polimerasa *Phusion High-Fidelity* (Thermo Scientific), genera templados largos con exactitud y rapidez, lo que la hace perfecta para trabajos de clonación y mutación. Adicionalmente, se amplificaron a un Tm de Alineamiento a 57°C, y para *CTT1* de 53.3°C

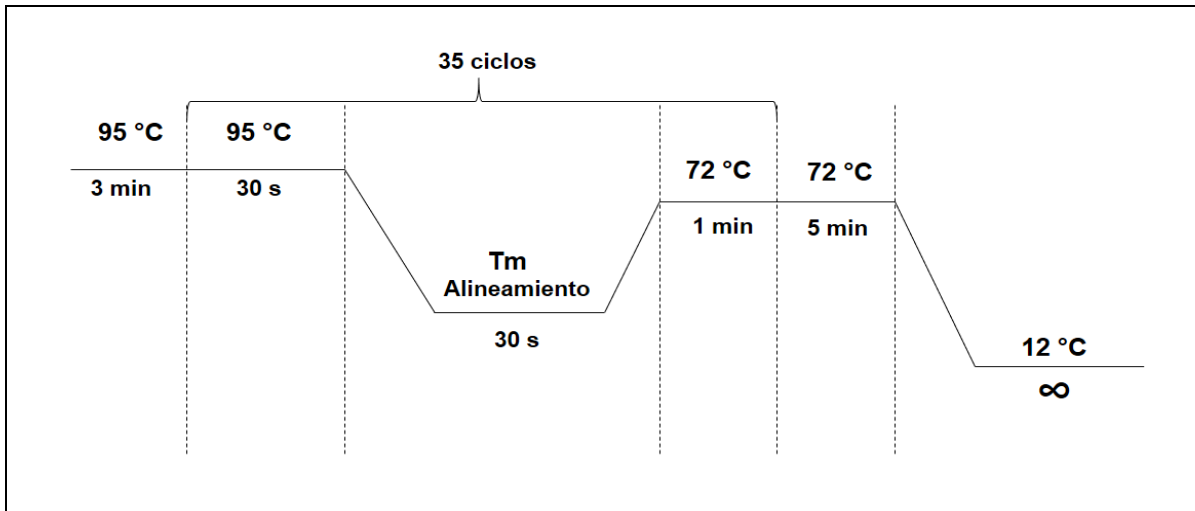


Figura 5.3 Programa para amplificación utilizado para generar productos de PCR con oligonucleótidos A, D y TEF-1FromTest utilizando como molde el ADN de nuestras cepas mutantes.

5.5.2 Células competentes mutantes

De las mutantes sencillas ya confirmadas, se generaron células competentes para hacer una segunda mutación. Se creció 5mL de cultivo de levadura toda la noche. De este se preparó un precultivo con una densidad óptica de 0,5-0.7 OD en 100mL de YPD. Se separaron 50mL de cultivo y centrifugaron (1500 rpm). Se repitió con agua estéril para una mejor purificación, para después lavar con 5mL de SORB (LiOAc, Tris PH 8.0, EDTA, Sorbitol) estéril y centrifugó. Las células se resuspendieron en 360 μ L de SORB y 40 μ L de ADN portador (ADN de Esperma de Salmón 10mg/mL) y se congelaron a -80°C (Tomado de LabLandry).

5.5.3 Transformación de células competentes

Del producto de PCR de cada gen para los tres marcadores (pAG 32, pAG25 y pUG6) se mezclaron 8 μ L con 20 μ L de levaduras competentes con un plásmido diferente al que inicialmente fue transformado, y que estaban en etapa exponencial (DO 0.5-0.7) y 100 μ L de Plate Mixture (LiOAc 100mM, Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA/NaOH 1mM pH 8, PEG 3350 40%). Se dejaron a temperatura ambiente por media hora. Posteriormente se añadieron 15 μ L de DMSO, se mezcló para cada plásmido de cada gen y se colocó en baño de maría (45°C)

durante 20 minutos. Las células se centrifugaron (1500 rpm) por 1 min y se cultivaron en 0.5 mL de YPD líquido. Para su recuperación, las células se dejaron en una incubadora por 5 horas a 30°C (Tomado de LabLandry). Las dobles mutantes se seleccionaron con medio de cultivo YPD con dos antibióticos diferentes ya que cada plásmido confiere resistencia a distintos antibióticos.

5.6 Identificación de proteínas modificadas (-SSH y -SOH)

5.6.1 Cultivos celulares para proteínas modificadas

Se utilizaron cultivos independientes de cada cepa y para cada protocolo de persulfuración y sulfenilación. Se dejó un precultivo de 5ml de cada cepa por más de 12h. Después se inocularon a un nuevo cultivo de 50 ml YPD a una densidad óptica (DO) de 0.2, se dejaron crecer de 4-6 hrs hasta la fase exponencial (DO: 0.5). Las células se recuperaron al centrifugar el cultivo a 2400 rpm por 5 min y se guardó la pastilla de células a -70°C.

5.6.2 Cuantificación de proteínas

Se colectaron células de levaduras en tubos de plástico de 15 ml a 2400 rpm por 5 minutos. Se lavaron con agua estéril. Se resuspendieron en buffer de lisis más inhibidores de proteasas (PMSF) con perlas de vidrio (0.5g) para romperlas por fricción en vortéx. Se recolectó todo el líquido en un tubo de 1.5ml con ayuda de una pipeta para después centrifugar a 14000 rpm por 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó proteína por el método de Pierce, a través de la calibración de una curva patrón de BSA con concentraciones conocidas a 660 nm.

5.6.3 Marcaje con Biotina-HPDP de grupos -SSH

Se resuspendieron células en 1ml de buffer de lisis HEN más inhibidores de proteasas con perlas de vidrio (0.5g) para su lisis por fricción en vortéx,

intercalando 30 segundos y 30 segundos incubando en hielo, se realizó este ciclo 9 veces. Se recuperó todo el líquido con la ayuda de una jeringa Hamilton para después volver a centrifugar (4°C 25 minutos 14 000 rpm). Después se bloquearon los grupos tiol libres de las proteínas con MMTS (20mM) en buffer HEN con SDS al 2.5%, a 50 °C más 1.4000 rpm por 20 minutos. Para eliminar el exceso del bloqueador MMTS, las proteínas se precipitaron en 2.5 volúmenes de acetona (99%) y centrifugaron a temperatura ambiente (3100 rpm por 5 min). La pastilla se solubilizó en buffer HEN con SDS 1% y se realizaron 2 rondas más de precipitación con acetona al 70%. Enseguida, se disolvió la pastilla de proteínas en 800 µl de buffer HENS con SDS al 1%, después se añadieron 200 µl de HPDP-biotina (4mM) previamente diluido en DMSO. Se incubó en periodos de 1-2 horas. Se lavó y precipitó nuevamente con acetona para eliminar el exceso de HPDP-Biotina-DMSO. Por último, se resuspendió la pastilla en 200 µl de Buffer HENS 1%

5.6.4 Marcaje con Biotina-HPDP de grupos -SOH

Se resuspendieron células en 1ml de ácido tricloroacético (TCA) 20%, para lisis celular con perlas de vidrio (0.5g), en vortéx (1 minuto) e incubando en hielo (1 minuto), se repitió este ciclo 10 veces más. Después se lavaron las perlas de vidrio con TCA 5% y se recuperó el sobrenadante con una jeringa Hamilton para centrifugar (4°C 10 minutos 14000 rpm). Se lavó la pastilla de proteínas con 1mL de acetona (-20°C) y se centrifugó a 14000 rpm, 2 minutos. Después se secó totalmente la proteína en el Speed Vac aproximadamente por 10 minutos. La pastilla se disolvió en 1mL de buffer desnaturalizante (BD). Para bloquear tioles libres de las proteínas se incubó con Yodoacetamina (IAM) 50 mM a 30°C por 45 minutos. Para eliminar agentes bloqueadores, los sobrenadantes fueron precipitados en TCA 10%. Después se lavó la pastilla en 1 mL de acetona pura y se secó con Speed Vac por 10 minutos. Se solubilizaron las pastillas en 1mL de BD con DTT 20 mM y se incubaron por 45 minutos a 30°C con agitación constante. La proteína se precipitó en TCA 10%, otra vez se lavó con acetona y secó. Para marcar los tioles modificados, se disolvió la pastilla en 1mL de BD y se

incubó con HPDP-Biotina 0.8 mM a 30°C por 45 minutos en agitación constante (1400 rpm). Luego se repitió el lavado con TCA 10%, acetona y secado en Speed Vac. Se diluyó proteína en 100-200 µl de Buffer TES 1% (Tris 20mM pH 7.5, EDTA 1mM, SDS 1%).

5.7 Identificación de MPT (Modificaciones postraduccionales)

Separamos nuestras proteínas con buffer de carga no reductor por SDS de poliacrilamida (Gel concentrador 10%, 100 V por 120 min) se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Imbolinon-P transfer) y se analizaron por Western Blotting. Para cada protocolo de sulfenilación o persulfuración se hizo un WB independiente. Se incubó toda la noche con el anticuerpo primario contra biotina (sigma, clone BN-34) en una proporción de 1:1000 en agitación a 4°C. Posteriormente se lavó con TBS 1X y otras tres veces con agua para volver a incubar con el anticuerpo secundario contra ratón en una proporción de 1:50000, el cual se pega a los grupos HPDP-Biotina, previamente S-modificados. Además, este último anticuerpo tiene acoplada la peroxidasa, la cual es responsable de generar la fluorescencia al agregar peróxido de hidrogeno y luminol.

6. RESULTADOS

6.1 Relaciones genéticas por STRING de los genes *YHB1* y *SFA1*

Se utilizó la herramienta bioinformática de STRING para identificar las interacciones físicas y funcionales de los genes y sus productos proteicos. Se consiguió una red completa con un valor de confianza media (0.400) de las interacciones la flavoproteína (*YHB1*) y alcohol deshidrogenasa (*SFA1*) tomando en cuenta la información publicada, son genes que se coexpresan y se encargan de la detoxificación de NO, utilizando como cofactor a glutatión y podemos observar claramente su interacción funcional determinado experimentalmente con el mejor puntaje de asociación 0.877. Los otros socios funcionales de YHB con mayor puntaje de asociación (0.733) es una desaminasa de porfobilinógeno (*HEM3*) involucrada en la biosíntesis del grupo Hemo. Como tercer socio funcional físico con mayor evidencia experimental y mayor puntaje de asociación (0.699), es una proteína aromática funcional que está involucrada en la biosíntesis del corismato, un precursor de los aminoácidos aromáticos (Figura 6.1)

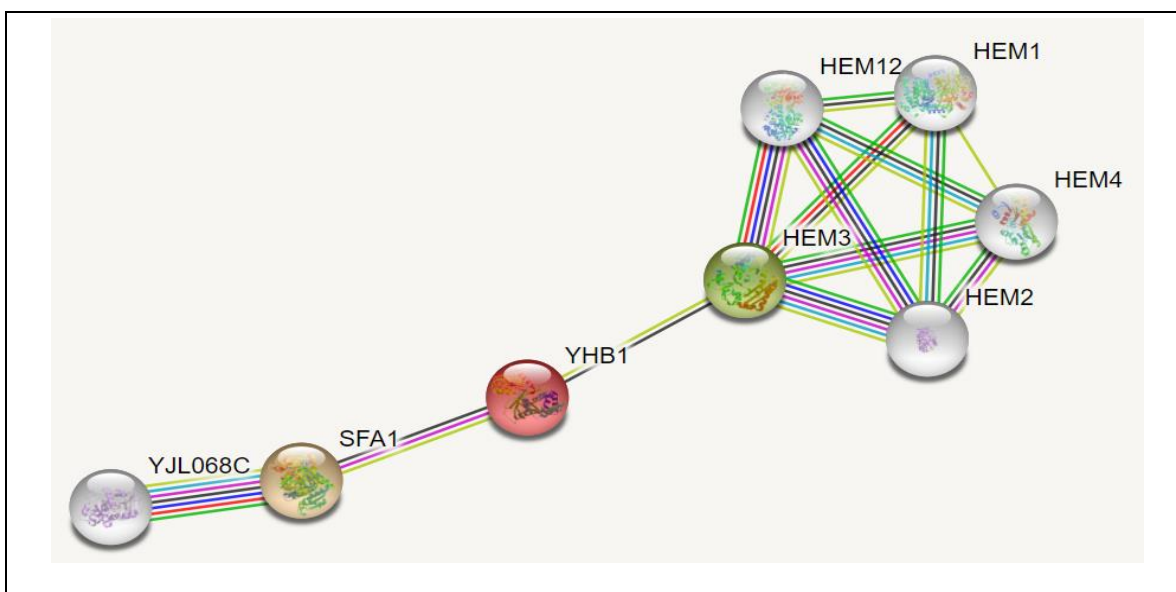


Figura 6.1 Red genética propuesta por STRING para el gen *YHB1*. *YHB1* tiene como primer socio funcional a *SFA1* y como segundo a *HEM3*. Valor de confianza media (0.400)

Por otro lado, las *interacciones físicas* más relevantes de *YHB1*, están relacionadas con el mantenimiento del DNA y la estructura de los cromosomas, así como complejos de chaperonas involucradas en la activación de proteínas de choque térmico con la vía de aminoácidos como la poliamina-N-acetil-transferasa (Figura 6.2).

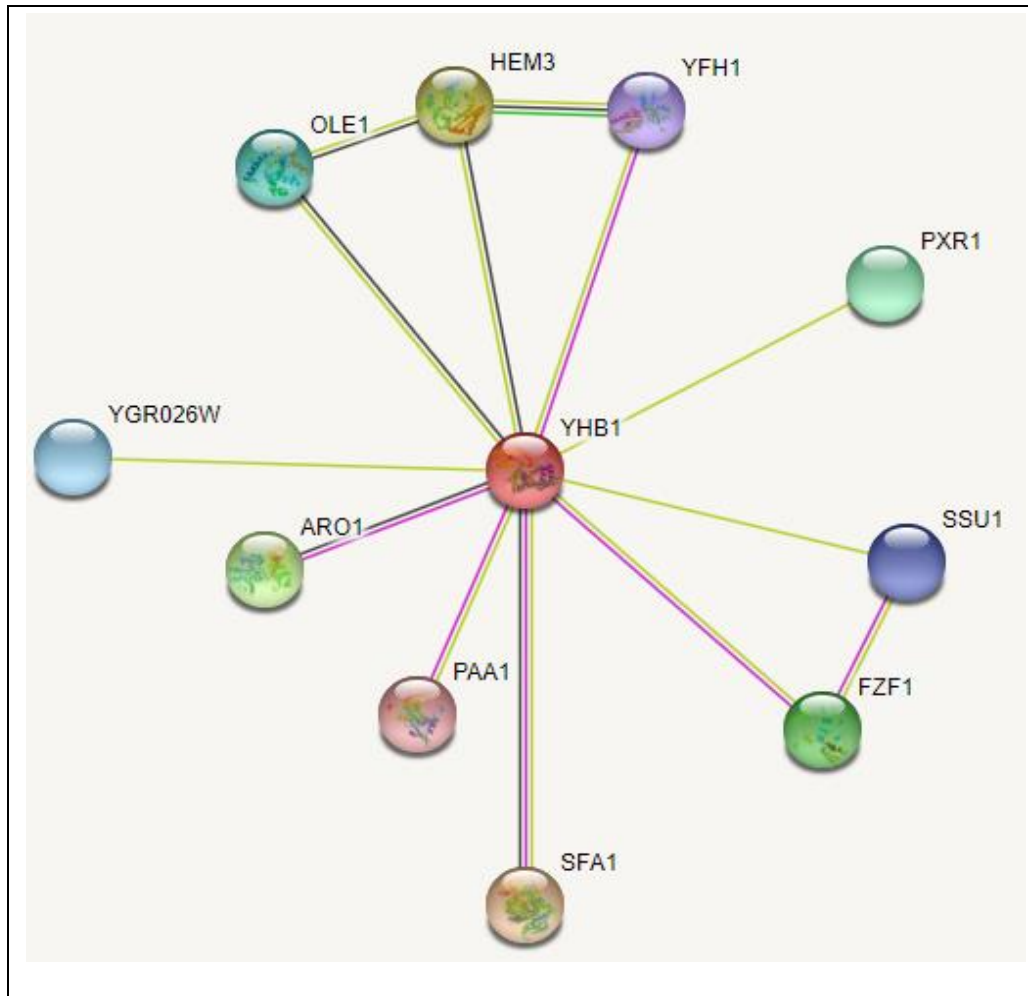


Figura 6.2 Red genética propuesta por STRING para el gen *SFA1*. Además de mantener la interacción funcional con varios genes enfocados en la desintoxicación, las relaciones físicas con el valor de confianza más alto son: *PAA1*, *YHF1*, *FZF1* y *ARO1*; genes relacionados con el mantenimiento del material genético. Valor de confianza media (0.400)

6.2 Relaciones genéticas de catalasas

Revisamos la red de interacción de la catalasa T citoplasmática (*CTT1*), con el mismo valor de confianza medio. Encontramos que las peroxirredoxinas como *AHP* y *TSA1* tienen el mayor puntaje de interacción física con *CTT1* (0.772). La glutatión oxidoreductasa (*GLR1*) también muestra un buen puntaje de interacción física (0.725) y no es para menos, ya que, es la encargada principal de mantener al glutatión reducido en citoplasma y mitocondria. Por último, era de esperar que también haya interacciones físicas con superóxido dismutasas (*SOD1*) y alcohol deshidrogenasa (*HFD1*) que son protagonistas en la homeostasis redox de la célula (Figura 6.3)

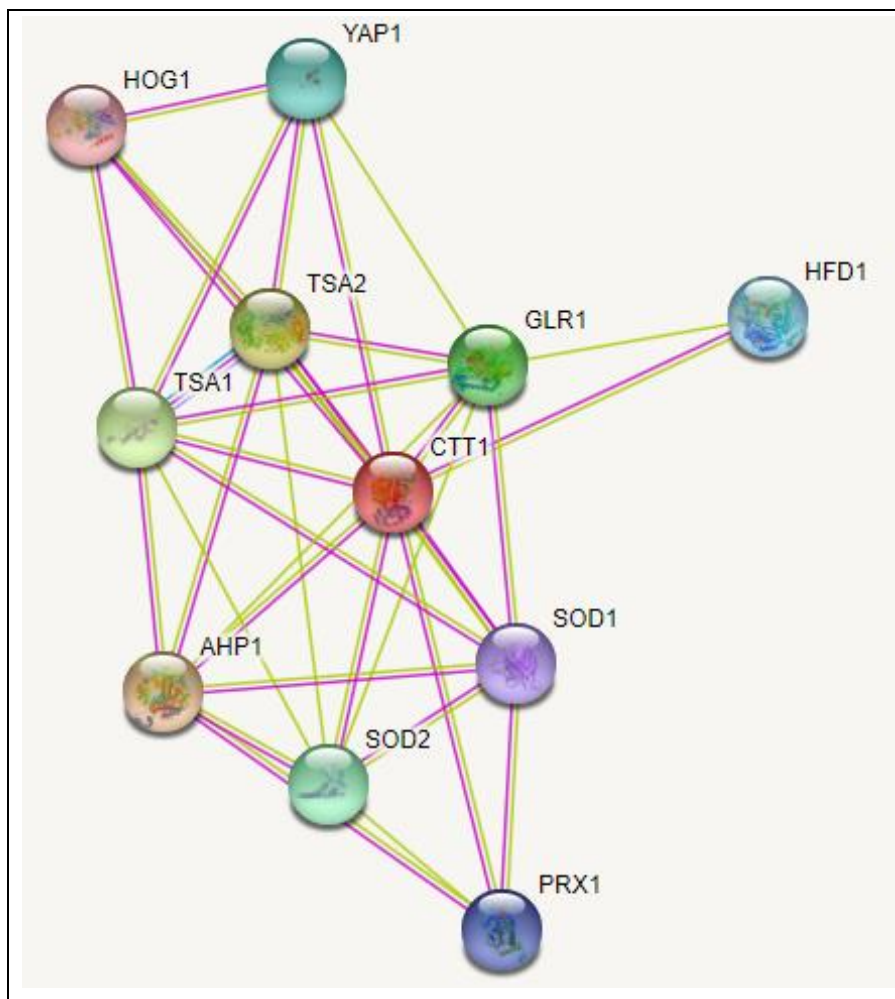


Figura 6.3 Red genética propuesta por STRING para el gen *CTT1*. Las interacciones físicas más fuertes son con peroxirredoxinas (*TSA2*, *PRX1*, *TSA1* y *AHP1*) y superóxido dismutasas. Valor de confianza media (0.400)

6.3 Generación de mutantes simples de cada gen $\Delta cta1$, $\Delta ctt1$, $\Delta sfa1$ y $\Delta yhb1$

Tabla 6.1 Predicciones del tamaño de los fragmentos esperados para cada cepa en relación con el vector utilizado, para ello se utilizó el programa Serial Cloner versión 2.6

Nombre de la cepa	<i>pAG25</i>	<i>pAG32</i>	<i>pUG6</i>	(Sin marcador) WT
$\Delta yhb1$	1954 nt	2410 nt	2259 nt	1847 nt

$\Delta sfa1$	1946 nt	2402 nt	2251 nt	1800 nt
$\Delta cta1$	1925 nt	2381 nt	2330 nt	2179 nt
$\Delta ctt1$	1871 nt	2327 nt	2176 nt	2254 nt

Para concretar la primera parte del proceso de formación del plásmido con los oligonucleótidos *forward* y *reverse*, se probaron diferentes temperaturas de alineamiento que previamente ya habían sido revisadas en *Serial-Cloner* desde el momento en que se generaron. Se exhibe como ejemplo de la primera parte del proceso de mutación, los fragmentos de pAG25, pAG32 y pUG6 hibridados con éxito con los primers *forward* y *reverse* a dos temperaturas de alineamiento 50°C y 57°C para el gen *CTA1* (Figura 6.4) Sólo obtuvimos para *CTA1* y *SFA1* los tres productos de amplificación que se originaron de la combinación de cada plásmido y gracias al choque térmico indicado se logró la inserción del plásmido como lo esperábamos. En la Figura 6.5 se muestra como ejemplo la confirmación por PCR del gen *CTA1* utilizando las regiones A-D usando sus respectivos oligonucleótidos, así como lo ejemplifica el esquema de la Figura 5.1 De acuerdo con las predicciones por *Serial-Cloner* y comparados con nuestros fragmentos son muy próximos (Tabla 6.1). De igual manera se corroboró y confirmó la mutación completa e individual de los genes *SFA1*, *YHB1*, *CTA1* y *CTT1*.

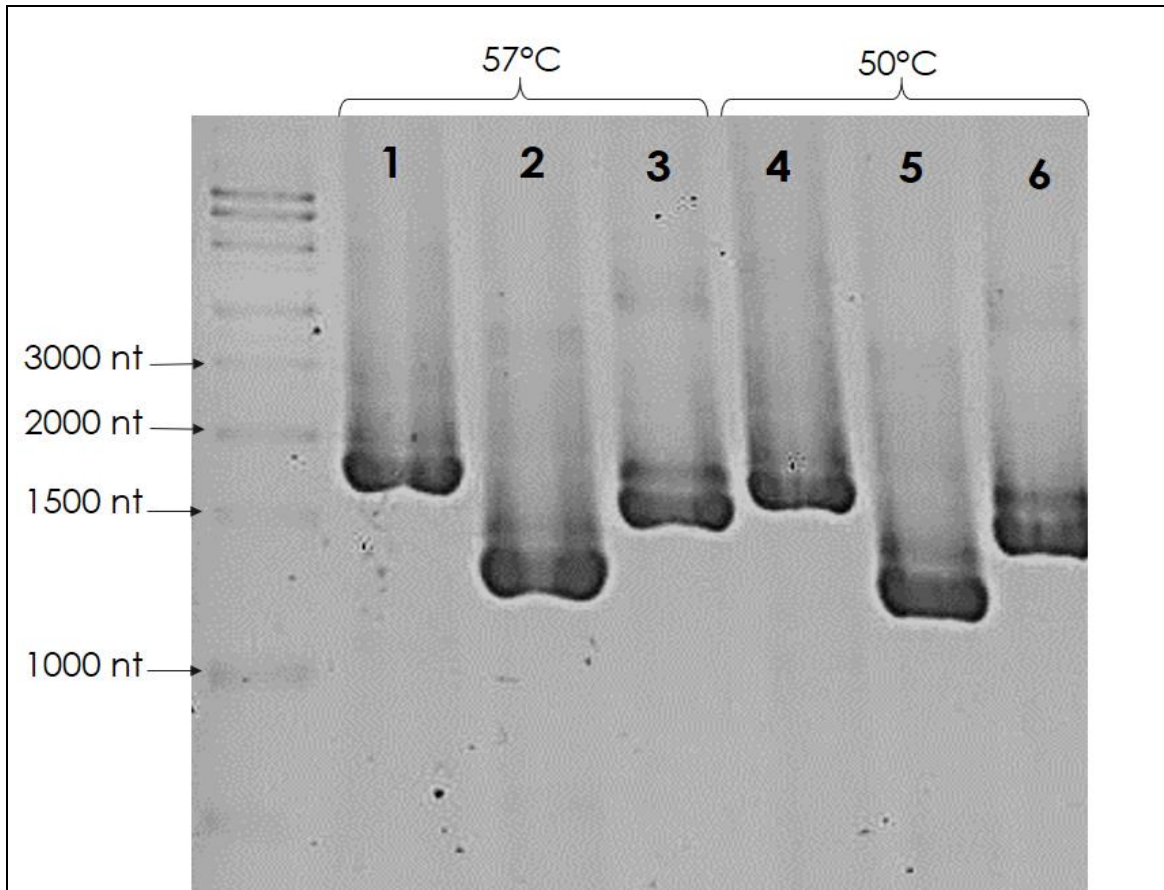


Figura 6.4 Electroforesis de la hibridación de *primers* y *CTA1* . Productos PCR usando los oligonucleótidos *Forward* y *Reverse* del gen *CTA1* hibridado con los vectores (pAG32, pAG25 y pUG6) probado a dos temperaturas de alineamiento: 57°C y 50°C. El carril 1 y 4 corresponden al pAG32; carril 2 y 5 pertenecen al pAG25; carril 3 y 6 son del pUG6. Electroforesis en gel de agarosa (8%).

Tomando siempre como referencia las predicciones de nuestro PCR *in sillico* en *Serial-Cloner* (Tabla 6.1), la diferencia entre el número de pb entre la cepa silvestre y las cepas con mutación del casete insertado difieren en poco más de 300 pb y en algunos casos menos de 100 pb, por lo que no es claro diferir y afirmar que todos los fragmentos corresponden a lo esperado en nuestro análisis bioinformático. Para afirmar nuestras posibles deleciones se hizo otra PCR de punto final, ahora utilizando una combinación de oligonucleótidos especial empezando por el primer “A” y luego TEFpromTest, precisamente delimitan una región promotora de la ORF del gen de selección. Como resultado se genera un fragmento corto (Esquema 5.1), por lo tanto, es más fiable confirmar la inserción en el sitio indicado porque sólo las mutantes tendrán esta región. Se usó como control negativo la cepa silvestre con fondo génico de BY4742.

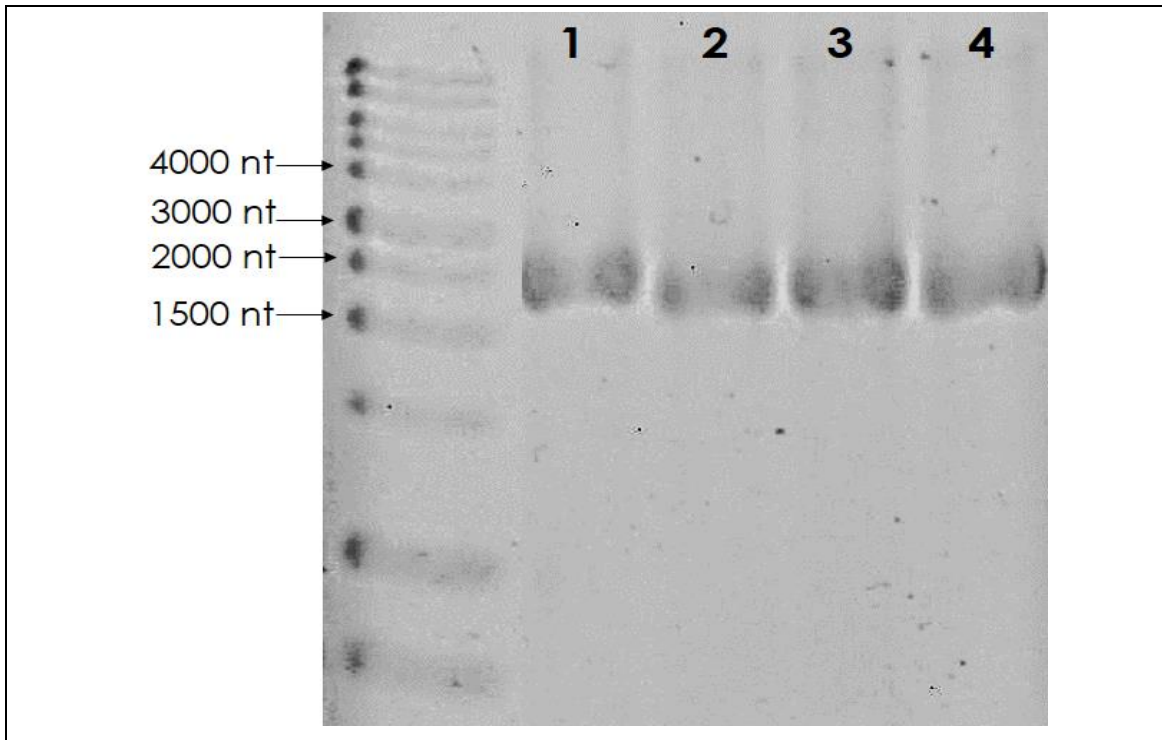


Figura 6.5 Electroforesis de cepas mutantes del gen *CTA1* usando los oligonucleótidos "A" y "D". El carril 1 muestra el fragmento de la cepa usando pAG32, el carril 2 muestra el fragmento de la cepa usando pAG25, el carril 3 pertenece a la cepa usando el pUG6 y carril 4 es el fragmento de la WT. Electroforesis en gel de agarosa (8%).

En la figura 6.6 se muestran los fragmentos resultantes del PCR con el *primer TEFpromTest*, y como dato general se esperan tamaños cortos de amplificación (700-900 pb). El gen que codifica para la catalasa fue el más efectivo para su delección ya que se logró la transformación exitosa con los tres marcadores de selección.

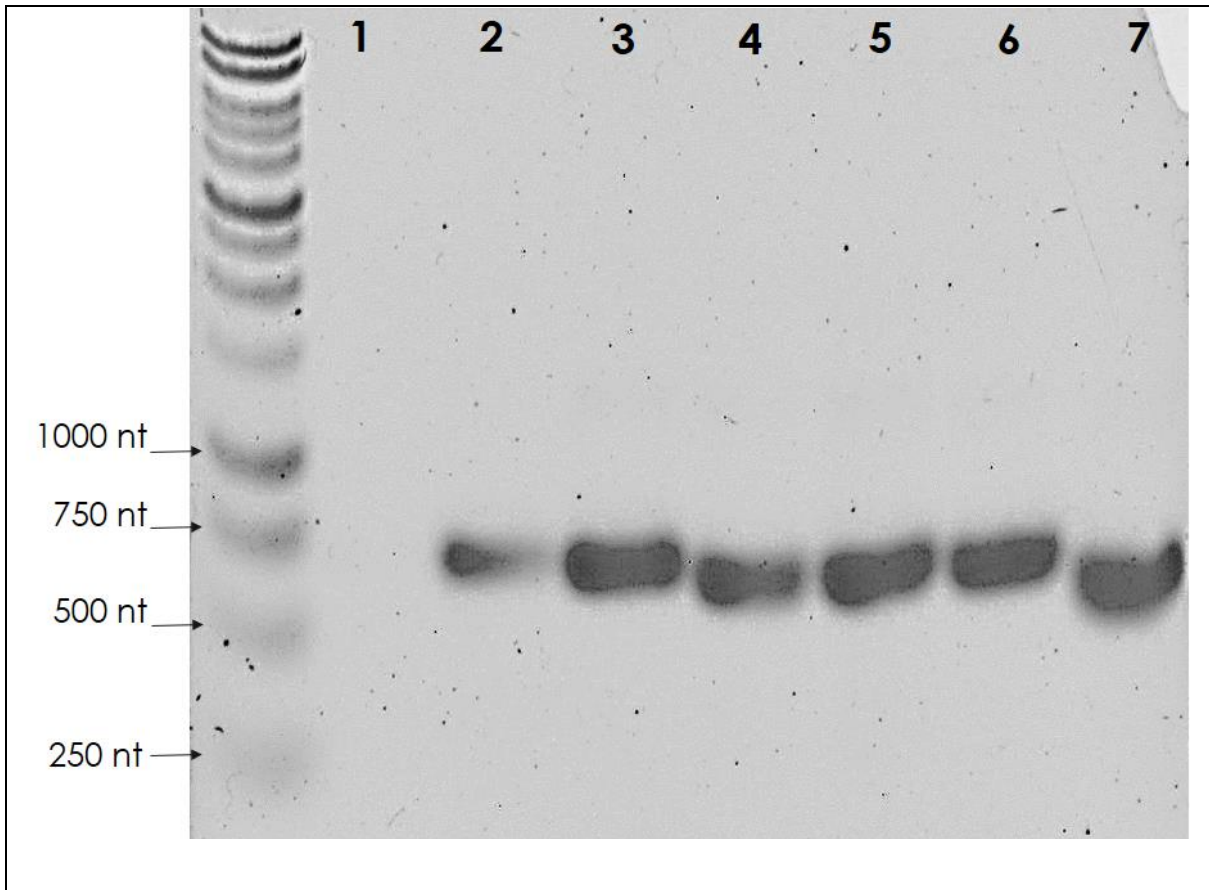


Figura 6.6 Electroforesis de confirmación de cepas mutantes del gen *CTA1* usando el oligonucleótido especial *TEFpromTest* y "A". El primer carril corresponde a la cepa WT, la cual no debe amplificar. Los carriles 2 y 3 muestran los fragmentos de dos colonias diferentes candidatas a mutantes usando el pAG32 (723 pb); los carriles 4 y 5 muestran los fragmentos de dos colonias candidatas a mutantes usando pAG25 (700 pb); y los carriles 6 y 7 pertenecen a dos fragmentos de posibles cepas mutantes usando el pUG6 (678 pb). Electroforesis en gel de agarosa (8%).

6.4 Generación de mutantes dobles $\Delta cta1$, $\Delta ctt1$ y $\Delta sfa1, \Delta yhb1$

Para confirmar las inserciones de nuestro nuevo plásmido y que la mutación pasada siga incluida, se corroboró por PCR punto final individual para cada cepa y para cada gen (Figura 6.7). Se probaron dos construcciones de $\Delta cta1, \Delta ctt1$ con dos combinaciones diferentes de plásmidos con la mutación en el gen $CTT1$, se identificó uno de estos fragmentos aproximadamente de 2300 pb que corresponde al plásmido pUG6, el otro fragmento se observó por debajo de 2Kb y corresponde al plásmido pAG25; lo que coincide con los tamaños esperados en la simulación por Serial-Cloner para este gen (Tabla 6.1). Por otra parte, para el gen $CTA1$ se usó la misma construcción con el plásmido pAG32 para las dos potenciales construcciones; el tamaño observado es de 2300 pb que fue lo esperado. Por último, la construcción de $\Delta sfa1: \Delta yhb1$ se transformó con los vectores pAG25 y pUG6, respectivamente; se esperaba un fragmento correspondiente a pUG6 de un tamaño aproximado de 2300 pb que no estuvo cerca de 2kb. Por último, al analizar el carril llamado "Mix", el cual es una reacción PCR de la combinación con todos los oligonucleótidos de confirmación de los 2 genes en cuestión, se observan cuatro bandas en escalera que reflejan el acoplamiento múltiple y no específico a diferentes regiones, lo que deriva en este efecto (Figura 6.7).

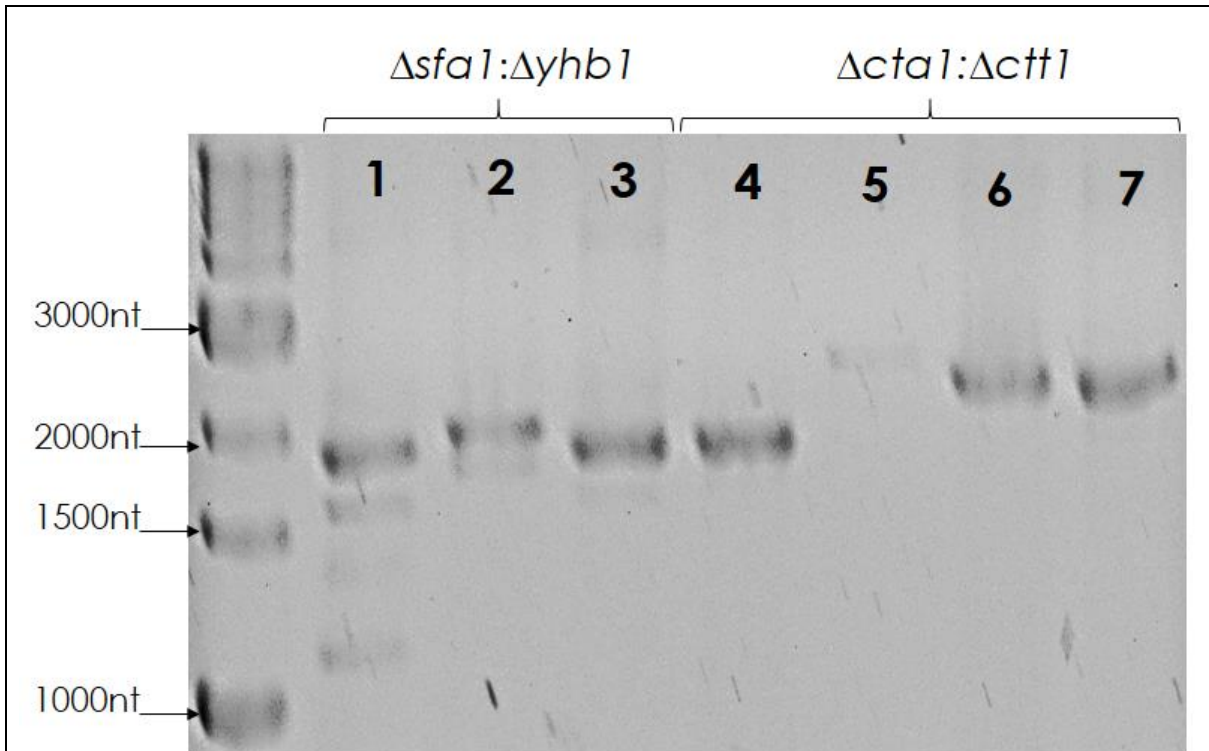


Figura 6.7 Electroforesis de confirmación de cepas dobles mutantes $\Delta yhb1:\Delta sfa1$ y $\Delta cta1:\Delta ctt1$ usando los oligonucleótidos "A" y "D". El carril 1 es un Mix de los 4 pares oligonucleótidos correspondientes a $\Delta yhb1$ y $\Delta sfa1$ mostrando 4 fragmentos de mal alineamiento; Los carriles 2 y 3 corresponden a una cepa candidata doble mutante, el carril 2 muestra el fragmento de $\Delta sfa1$ que corresponde a la mutación con pAG25, el carril 3 muestra el fragmento de $\Delta yhb1$ con la mutación de pUG6; los carriles 4 y 5 corresponden a la posible cepa $\Delta cta1:\Delta ctt1$, el carril 4 es el fragmento de $\Delta ctt1$ con el vector pAG25; el carril 5 es amplificado de $\Delta cta1$ con pAG32. Por último, el carril 6 y 7 corresponden a otra cepa doble mutante usando otra configuración de plásmidos, el 6 muestra la mutación con pUG6 de $\Delta ctt1$ y el carril 7 muestra el fragmento de $\Delta cta1$ con pAG32. Electroforesis en gel de agarosa (8%).

Por segunda ocasión se realizó un PCR de confirmación utilizando el oligonucleótido especial TEFpromTEST, para lo que esperamos fragmentos muy cortos en caso de haberse insertado (700-800 pb). Además, se agregaron para cada gen el control negativo, utilizando ADN de la cepa WT (BY4742) la cual no amplificó debido a que no tiene el casete insertado. Como se muestra en la Figura 6.8 se obtuvieron los fragmentos esperados de un intervalo de 700-800 pb, corroborando la mutación doble para cada gen y afirmando la creación de $\Delta cta1(32), \Delta ctt1(6)$ y $\Delta sfa1(25):\Delta yhb1(6)$

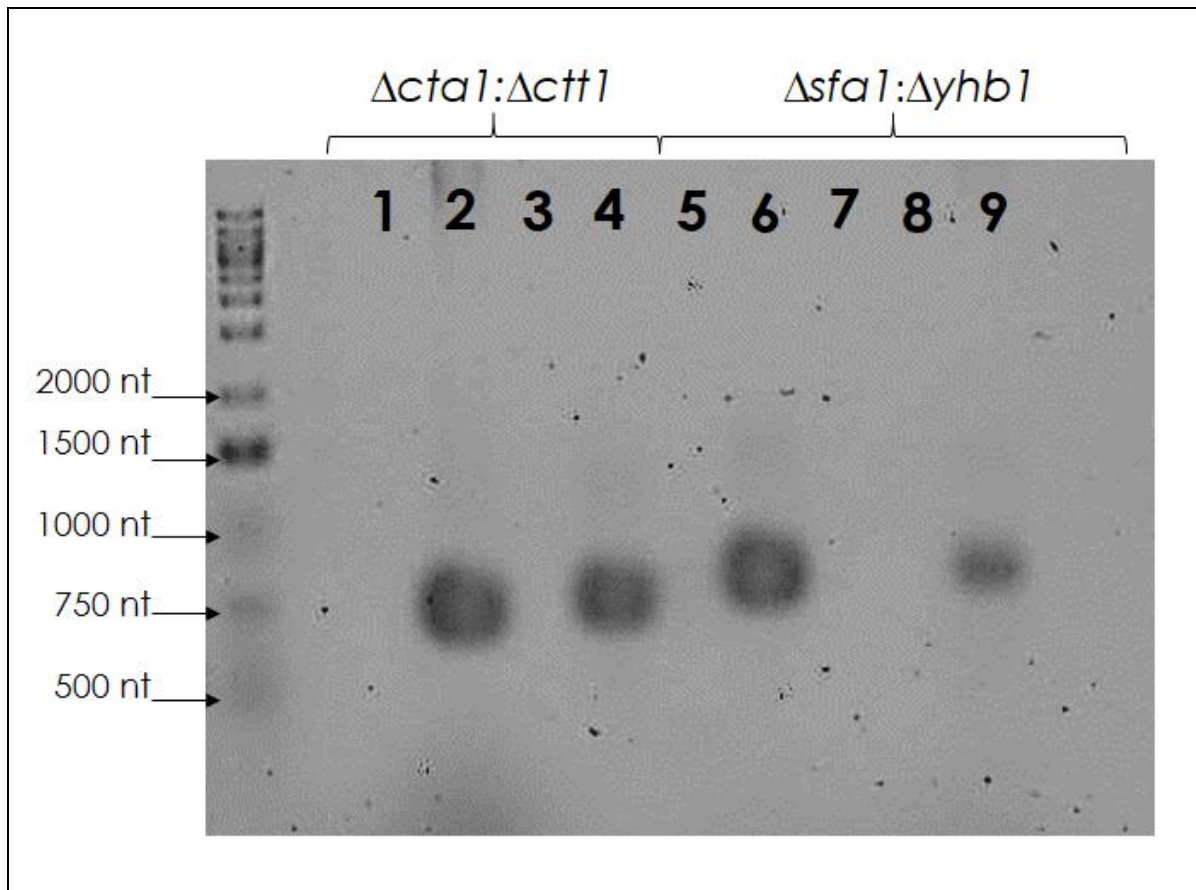


Figura 6.8 Electroforesis de confirmación de cepas dobles mutantes $\Delta yhb1:\Delta sfa1$ y $\Delta cta1:\Delta ctt1$ usando los oligonucleótidos "A" y *TEFpromtest*. Los carriles 1, 3, 5, 7 y 8 muestran la amplificación de la cepa WT de los genes *CTA1*, *CTT1*, *SFA1* y *YHB1*, respectivamente, portándose como nuestros controles negativos los cuales no deberían de amplificar; los carriles 2 y 4 corresponden a una cepa candidata doble mutante $\Delta cta1:\Delta ctt1$, el carril 2 muestra el fragmento de *Δcta1* mutado con pAG25, el carril 4 muestra el fragmento de *Δctt1* con la mutación de pUG6; los carriles 6 y 9 corresponden a una cepa candidata doble mutante $\Delta sfa1:\Delta yhb1$, el carril 6 es el fragmento de *Δsfa1* con el vector pAG25; el carril 9 es amplificado de *Δyhb1* con pAG32. Electroforesis en gel de agarosa (8%).

6.5 Patrón postraducciona de la S-Persulfuración

Para corroborar nuestra hipótesis basado en la dinámica del paisaje general postraducciona de nuestras mutantes que acumulan NO y H₂O₂ en comparación con nuestra cepa silvestre BY4742 α . Dejamos crecer cultivos a partir de OD 0.2 hasta 0.5 considerándose fase exponencial de las 3 cepas. Para medir la señal de persulfuración se realizó un marcaje de proteínas independiente para el de sulfenilación, se detectaron mediante Western Blotting con un anticuerpo anti-biotina de cisteínas previamente modificadas. En general la señal de persulfuración en nuestras mutante $\Delta cta1, ctt1$ es mayor que la cepa silvestre y todavía un poco más que la mutante $\Delta yhb1, sfa1$. Podemos observar claramente como la señal de S-persulfuración disminuyó en proteínas igual o mayores que 150 kDa en nuestro carril 1 y 3. Es clara la abundancia de señal de persulfuración en nuestra mutante que acumula H₂O₂ (carril 2). También se pierde señal de proteínas modificadas de un tamaño aproximado de 50kDa y 35 kDa. Lo más interesante es que a pesar de acumular RNS, la cepa $\Delta yhb1:sfa1$ (carril 3) no tiene muy marcado el patrón de persulfuración, de hecho se pierde la señal en proteínas de un tamaño aproximado a 40-30 kDa.

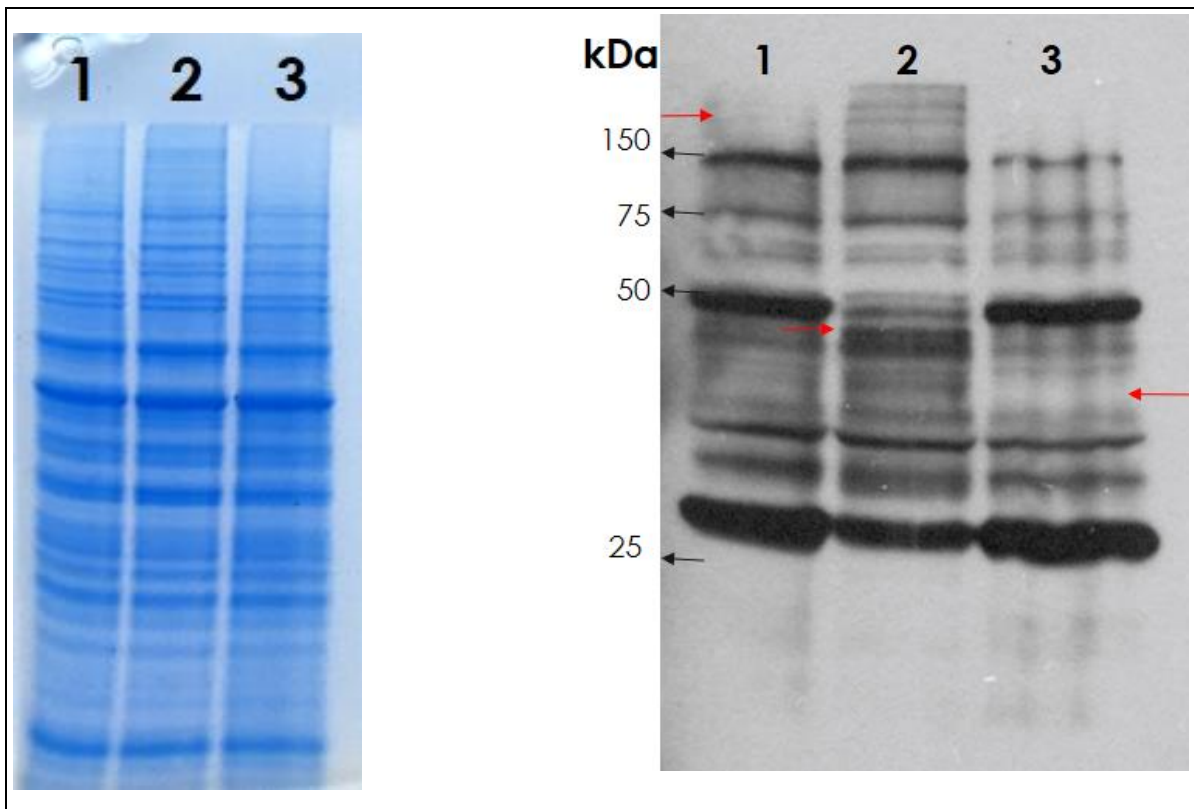


Figura 6.9 Electroforesis del total de proteínas (izquierda) y Western Blotting de proteínas persulfuradas (derecha). El primer carril corresponde a nuestra cepa control BY4742 α WT y como señala nuestra flecha roja antes de los 150KDa se pierde la señal de proteínas modificadas. El segundo carril corresponde a nuestra cepa doble mutante $\Delta cta1, \Delta ctt1$; la flecha roja señala un aumento de señal de proteínas modificadas con un tamaño aproximado de 40 kDa en comparación con la WT. El tercer carril corresponde a la cepa doble mutante $\Delta sfa1, \Delta yhb1$, en general vemos una leve pérdida de señal en todos los tamaños de proteínas pero la flecha roja señala principalmente pérdida de persulfuración en proteínas de los 30 kDa y un aumento de señal en los 50kDa y 30 kDa. Electroforesis en gel de poliacrilamida y Western Blotting de proteínas marcadas con anticuerpo primario contra biotina (sigma, clone BN-34), 1:100 y un anticuerpo secundario contra ratón 1:50 000.

6.6 Patrón postraduccional de la S-Sulfenilación

Para visualizar el paisaje de proteínas S-Sulfeniladas, realizamos el WB de las tres cepas. El patrón general de la señal de proteínas modificadas es interesante debido a la pérdida de señal de la mutante $\Delta yhb1, sfa1$, como se ve claramente la pérdida de bandeo de una gran región que abarca los 35 a 10 kDa; por segunda vez, es la cepa con menos señal de proteínas modificadas. Por otra parte, en el carril 2 también observamos una ligera pérdida de señal del bandeo por debajo

de 50 y 20 kDa que en comparación con la WT se mantiene una señal constante de proteínas sulfeniladas de todos los tamaños.

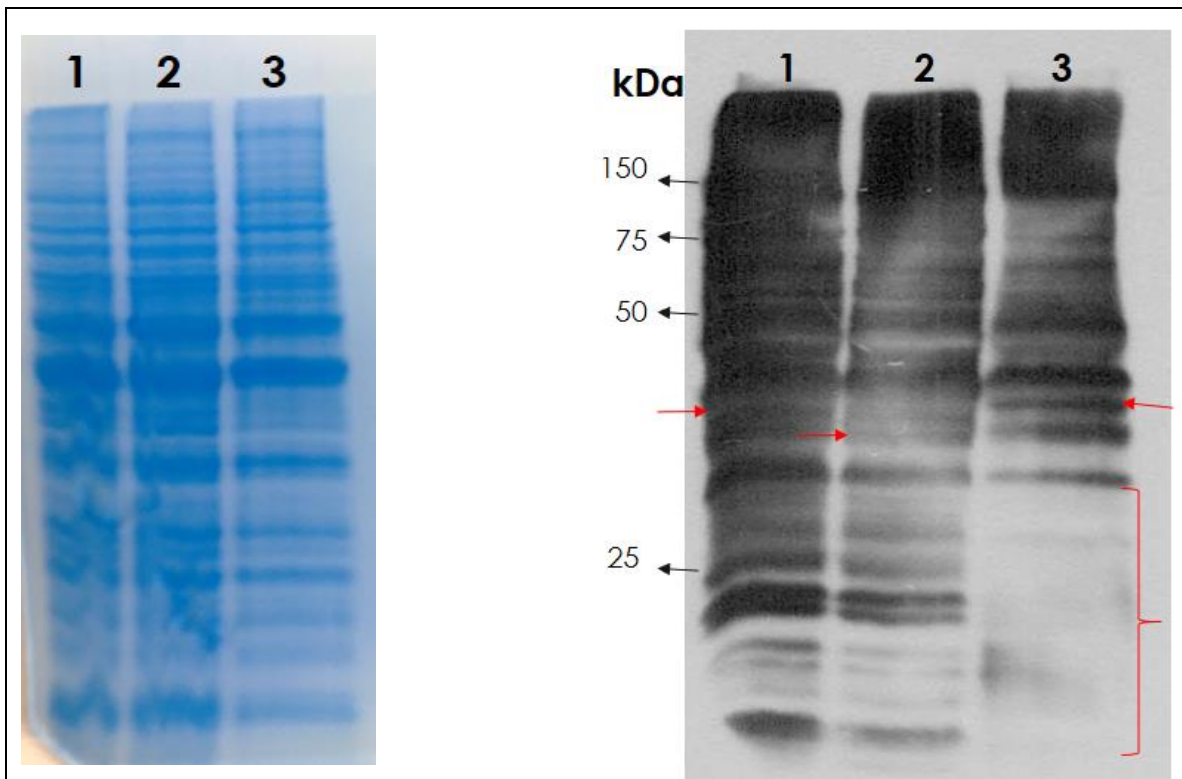


Figura 6.10 Electroforesis del total de proteína (izquierda) y Western Blotting de proteínas sulfeniladas (derecha). El primer carril corresponde a nuestra cepa control BY4742 α WT y como señala la flecha roja antes de los 40KDa se pierde ligeramente la señal de proteínas modificadas. El segundo carril corresponde a nuestra cepa doble mutante $\Delta cta1, \Delta ctt1$; la flecha roja señala un aumento de señal de proteínas modificadas con un tamaño aproximado de 35 kDa en comparación con la WT. El tercer carril corresponde a la cepa doble mutante $\Delta sfa1, \Delta yhb1$, observamos una gran pérdida de señal indicada por el corchete en rojo a partir de los 30 kDa hasta tamaños más pequeños. Electroforesis en gel de poliacrilamida y Western Blotting de proteínas sulfeniladas con anticuerpo primario contra biotina (sigma, clone BN-34), 1:100 y un anticuerpo secundario contra ratón 1:50 000.

7. DISCUSIÓN

7.1 Redes genéticas y mutantes que acumulan RNS y ROS

Los radicales libres derivados de la oxidación de moléculas involucradas en procesos biológicos como la respiración celular son importantes para mantener una homeostasis redox y que evolutivamente se han utilizado por las células para señalar procesos biológicos de contextos muy específicos. Sin embargo, cuando se supera la capacidad de desintoxicación de ROS, las células fúngicas cuentan con respuestas bien caracterizadas y conservadas que implican la activación de ARNm y por ende la expresión de proteínas de desintoxicación y reparación del estrés que en conjunto forman sistemas de cortafuegos como los ampliamente conocidos Tiorredoxinas/Glutarredoxinas/Glutatión. De cierto modo en cualquier tipo de estrés se activan catalasas, proteínas de choque térmico, superóxido dismutasas y peroxiredoxinas (Figura 6.3), estas últimas han tomado fuerza en otros campos, ya que, como *TSA1* modula el envejecimiento, la resistencia al H_2O_2 y corta de tajo la señalización de nutrientes por sulfenilación a una cinasa conocida como *PKA* y da como resultado el aumento de la longevidad (Roger, *et al.*, 2020).

Corroborado con nuestra investigación de redes genéticas en STRING (Figura 6.3), era de esperar que las proteínas pertenecientes a estos sistemas estén directamente relacionadas y coordina con los resultados de Kim y col. en 2005, quienes indicaron que el estrés oxidativo resultado del choque térmico (43°C) puede inducir una estimulación más profunda de trehalosa, enzimas antioxidantes, proteínas de choque térmico, así como un aumento en las proporciones de ácidos grasos insaturados (USFA, en inglés). Esto podría contribuir a las funciones de protección celular para el mantenimiento de la homeostasis celular y mejorar la fluidez de la membrana, que es particularmente el caso del ácido oleico (C18: 1).

Particularmente, otros estudios enfocados en la fisiología de *Saccharomyces* después de la exposición a muchos estímulos como el choque térmico, alta presión hidrostática y H_2O_2 , muestran el papel que podría tener el NO contra la

protección del estrés y la muerte celular programada y pesé a no hacer un ensayo de tasa de supervivencia, fueron menos colonias las que resultaron mutantes (Domitrovic *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2007; Nishimura, Kawahara & Takagi, 2013). Por lo que la evidencia nos ha enseñado el óxido nítrico actúa como un señalizador maestro de estos sistemas. Un ejemplo muy claro y que nos da un entendimiento del papel de los gasotransmisores en el control del estrés por modificaciones postraduccionales de intermediarios en la señalización del estrés y apoptosis. Justo como lo encontraron Liu y col. en 2015, usaron H₂O₂ y observaron que la subunidad catalítica de caseína cinasa 2 (*CKA2*) parece tener actividad de *NOS* acumulando el gas, lo cual se relacionó con la inducción de apoptosis y posteriormente su tolerancia a altas temperaturas; que es un poco contradictorio a lo observado por Almeida y col. en 2007 quienes mostraron una reducida tasa de supervivencia en aquellas células que acumulaban NO y que era respectiva la cantidad de este gas al tiempo cronológico que llevaban las células (Liu *et al.*, 2015).

La interacción física propuesta por STRING (figura 6.1 y 6.2) entre *YHB1* y *SFA1*, se tiene como referencia los primeros reportes en mutantes *por Foster y col. 2009* donde se estableció su actividad en conjunto, mantiene la homeostasis del estrés nitrosativo y la atenuación de la S-Nitrosilación de proteínas. Además de señalar a *GSNOR* o *SFA1* como un regulador del estado estacionario que favorece la unión de grupos SNO en proteínas de grupos metálicos (Foster *et al.*, 2009). En un contexto celular más específico, Majumdar y col. en el 2012 han reportado que la nitrosilación de algunas ciclinas (*CDK2*) y ribonucleótido-reductasas (*RRB*) inhiben su actividad y detienen la fase S del ciclo celular bajo estrés nitrosativo, esto es interesante porque en comparación con el estrés oxidativo por exposición a H₂O₂ y altas temperaturas, flavoproteínas como Tah18 han tomado la actividad de *NOS*, y el NO puede señalar sistémicamente la muerte celular programada en *S. cerevisiae* (Almeida *et al.*, 2007; Nishimura *et al.*, 2013 y Yoshikawa *et al.*, 2018).

Sin perder de vista la fisiología del H₂S y más en específico de la persulfuración, es importante mencionar que la regulación de la apoptosis es mediada por la

persulfuración y más en específico por polisulfuros que modifican las cisteínas del sitio activo de las caspasa-3/9 y sus efectos son antagonistas al sistema reductasa (Trx/TrxR) (Braunstein *et al.*, 2020). Por otro lado, tenemos la otra cara del tiosulfato, el cual en muchos estudios es usado como un donador biológico del H₂S a pesar de que recientemente se evidenció que a diferentes pH ácidos puede liberar intermediarios como ácidos sulfúricos/sulfurosos y directamente inhibir la cadena transportadora de electrones al persulfurar el citocromo C oxidasa, de tal manera, que resulta tóxico para el crecimiento de levaduras (Chen *et al.*, 2021).

Por último, en nuestro estudio no comparamos las tres marcas postraduccionales y no añadimos otra variable de un estresor externo como el H₂O₂, por ahora, no podemos afirmar si estas modificaciones hubiesen tenido ese mismo efecto teniendo en cuenta el cross-talk con otras marcas. Con la intención de estudiar la acumulación de estos agentes reflejada en los patrones generales postraduccionales y sin perder la pureza del ambiente estequiométrico que, a diferencia de la mayoría de los estudios enfocados en estos genes, se agregan donadores externos de NO, H₂O₂ y H₂S; como etanoato de sodio o tiosulfato de sodio.

7.2 Persulfuración de mutantes que acumulan ROS y RNS

Es razonable pensar que la cepa $\Delta ctt1, \Delta cta1$ muestre más señal de S-persulfuración en general para todos los tamaños, aunque es interesante y específica la pérdida de señal a los 50kDa, a pesar de que hubo persulfuración de otras proteínas más grandes que no se observaron en la cepa silvestre y la mutante $\Delta yhb1, \Delta sfa1$ (figura 6.10). La idea de la atenuación de persulfuros contra especies reactivas y/o estrés ya se venía reportando en varias ramas de la bioquímica, pero fue hasta el estudio de Zivanovic y col. en 2019, que confirman la persulfuración como una modificación fundamental para la protección de cisteínas ante el ataque oxidante de la sulfenilación entre otras modificaciones postraduccionales oxidantes irreversibles (oxMTP) por ende aumenta la longevidad celular y podría ser la razón por lo que en esta cepa se acumula más

señal. De igual manera ya han puesto en evidencia el efecto protector del H₂S es conservado evolutivamente en muchos organismos eucariontes desde hongos, plantas, invertebrados y vertebrados (Zivanovic *et al.*, 2019). Esta idea se refugia por lo encontrado por Doka y col. en 2020, quienes lograron entablar el crosstalk más interesante de estas dos modificaciones antagonistas y que podrían presentarse en cualquiera de las dos cepas: los sistemas de *Trx* y *GSH* son necesarios para mantener el estado reducido de proteínas, en especial de *TrxR1* y *TRP14* juntas son necesarias para reducir persulfuros previamente oxidados. Concluimos que los per/polisulfuros son importantes para reaccionar con agentes oxidantes y reducirlos, además de que estos mismos se siguen modificando por agentes oxidantes generando otras modificaciones oxidantes que no se habían identificado, son parecidos al ácido sulfénico; y que para recuperar la reducción del tiol habría primero que formarse el disulfuro intrínseco que hace reversible las marcas oxidantes (Doka *et al.*, 2020).

Por otra parte, nuestra cepa mutante $\Delta yhb1, \Delta sfa1$ a nivel general tuvo pérdida en la señal de persulfuración en comparación con nuestro control y la otra cepa que acumula ROS (figura 6.10). Se nos ocurren varias explicaciones para discernir esta pérdida de señal pero la más coherente, es la explicación expuesta por Altaany y col. 2014, demuestran un modelo biológico que subyace del origen y control de producción de NO por H₂S; lo que resulta más interesante es la participación de tres modificaciones postraduccionales, teniendo a *CSE1* como el efector de la persulfuración de *eNOS* para su dimerización de modo que pueda fosforilarse por *SHP2* para producir NO, el mismo aumento de NO inhibe *eNOS* por nitrosilación; y aunque no podemos obtener el mismo efecto fisiológico en levaduras, podemos predecir que es el mismo mecanismo molecular que compartimos por la homología de *CSE1* con *CYS4* sospechamos que puede haber cierta actividad de persulfurasa y pueda interactuar con *YHB1* u otras sintasas de NO, mejor dicho, creemos que hay un equilibrio muy fino entre la producción de ambos radicales, la que podría ser la razón principal de la pérdida de persulfuración al no estar presente su sustrato *YHB1* ó *SFA1*.

Si hacemos un paréntesis en la nitrosilación, Foster y Stamler, fueron los primeros investigadores que decidieron tomar a la marca fisiológicamente relevante. En sus dobles mutantes de *GSNOR1* y *YHB1* lograron observar 10 veces más nitrosilación que en *YHB1* de modo que los análisis revelaron una influencia sustancial de la estereoquímica del donante de NO y su estructura sobre la eficiencia de la S-nitrosilación, así como un papel importante e imprevisto como el efector alostérico de NO. Esto posiblemente estaría influenciando por la persulfuración de nuestra mutante $\Delta sfa1, \Delta yhb1$, ya que es evidente que es la cepa con menos cobertura y señal de persulfuración en comparación con la mutante que acumula RNS y la cepa WT (Foster *et al.*, 2009). La revisión científica publicada por Cortesse Krott y col. en 2015, los primeros en aglutinar y establecer las redes de reacciones químicas más importantes que generan radicales intermediarios con o sin carga de las interacciones del NO y H₂S, en general, mencionan tres productos principales: nitrosopersulfuro, polisulfuros y dinitrososulfito, cada uno con una bioquímica distinta y que bien podría ser intermediaria de alguna modificación, principalmente enfocada en la persulfuración y que podría explicar por qué sólo en muy específicos intervalos (30kDa y 50kDa) se acumulan proteínas modificadas.

Podría ser que en el futuro se investigue a fondo la fisiología de los intermediarios de los dos gases, así como lo han ido incursionado Eberhardt y col. en 2015 en la señalización del control vascular en células endoteliales del músculo liso, aquí proponen al nitroxil como intermediario principal de la interacción de polisulfuros (H₂S_n) y NO, y es responsable de estimular al receptor *TRPA* para formar el complejo HNO-TRPA1-CGRP. Con el tiempo se ha encontrado la presencia en papeles fisiológicos más específicos del nitroxil, que en muchos artículos se ha probado su poder vasodilatador y regulador de la presión arterial en células del músculo liso de las arterias (King *et al.*, 2015; Shoman y Aly, 2016; Szijartó *et al* 2018). Curiosamente, la formación de este compuesto es termodinámicamente difícil en condiciones fisiológicas, y se presume que la acción de porfirinas de Fe³⁺

y la interacción dependiendo de la biodisponibilidad del sustrato, es necesaria para oxidar NO y posteriormente ser blanco de un ataque nucleofílico de HS⁻ y formar HSNO que al hidrolizarse liberaría HNO y H₂S, concediéndole un papel de reservorio biológico de persulfuros (Ivanovic y Filipovic, 2019).

7.3 Sulfenilación en mutantes que acumulan ROS y RNS

En nuestra cepa doble mutante $\Delta ctt1, \Delta cta1$ ahora se producen ROS endógenas gracias a las deleciones en las catalasas que convertían el H₂O₂ a agua. Ya se ha confirmado que las mutantes deficientes en catalasas son más sensibles al estrés oxidativo por H₂O₂ y otros tipos de estrés ambiental (Izawa *et al.*, 2013; Nishimoto *et al.*, 2015). Es importante mencionar el rol fisiológico que ha ido tomando la sulfenilación, estudios un poco más recientes han reportado la sulfenilación de grandes reguladores del metabolismo, uno de ellos es la cinasa *IRE-1* que se ha conservado evolutivamente y que al parecer se inhibe su función de activar la UPR del retículo endoplásmico (RE) por medio de sulfenilación y al mismo tiempo activando la cascada de *MAPK/p38*, por consiguiente, se activan factores de transcripción que orquestan el estrés como *Nrf2* y su ortólogo en humanos *SKN-1* y mantienen la homeostasis celular (Horihan *et al.*, 2016). Por lo tanto, siguiendo nuestra hipótesis, es claro observar la sulfenilación a nivel general $\Delta ctt1, \Delta cta1$ (*carril 2*), aunque no haya diferencias visibles con respecto al control (Figura 27). De igual manera, estudios previos ya han reportado la sulfenilación de cisteína como un marcador fundamental de cualquier estrés ambiental, incluso sí es detectado desde cantidades pequeñas de oxidantes ambientales y realizado con la misma técnica de Western Blotting con la etiqueta de biotina que nosotros usamos (Wages *et al.*, 2015). No hemos encontrado una explicación de la versatilidad del H₂O₂, la sulfenilación como marca predominante, presente en casi cualquier contexto celular que contrasta con lo que hemos podido observar, no podemos encontrar diferencias; aun cuando se incursionó en el efecto de H₂O₂ y no tuvimos resultados concluyentes, al menos, se logró tener más experiencia en la planeación y optimización de la técnica de Western-blotting.

Uno de los resultados más inesperados fue la gran pérdida de señal en el carril 3 de la cepa doble mutante $\Delta sfa1, \Delta yhb1$ a partir de los 30 kDa hasta intervalos más pequeños, indicada por el corchete en rojo (figura 6.11). Nos preguntamos ¿por qué paso esto?, ya que, si tomamos en cuenta los primeros reportes de acumulación de nitrosotioles en suero humano, se detectó que casi el 96% estaba unido a una proteína y de este el 82% se encuentra nitrosilando la cisteína 32 de la albumina sérica (Stamler *et al.*, 1992). Pese a que nosotros no evaluamos nitrosilación en cisteína esperábamos que por la acumulación de NO podría afectar el ambiente estequiométrico y aumentar la sulfenilación, aunque no fue así. En resumen, la poca señal en esta cepa puede deberse a que la sulfenilación típicamente aumenta la reactividad del residuo de cisteína propenso a modificarse y la nitrosilación decrece la reactividad pese a que haya conjugaciones con radicales de oxígeno (Bindu y Solomon, 2015).

En otra perspectiva y tomando datos anteriores de patrones de nitrosilación en dobles mutantes que acumulan NO hechos por Foster y Stamler, 2009 y otras revisiones hechas por Astuti y Rika en 2016, calificaron a la nitrosilación como una marca promiscua, en ese sentido, podría enlazarse o transitar al sulfenilo de la oxidación y sería una de las explicaciones de la pérdida de señal en $\Delta sfa1, \Delta yhb1$ y por si fuera poco, mientras la delección de ambos genes podría rescatarse levemente debido a *TAH18* una flavoproteína parecida a *YHB1* de la que se ha reportado entabla la transferencia de electrones de NADPH a los clusters de Fe-S y resulta aún más atractivo que posee la función catalítica de NOS sin tener el dominio oxigenasa precisamente cuando el ambiente se torna a un estrés oxidativo, como puede ser el caso de $\Delta sfa1, \Delta yhb1$ y podría ser un parteaguas en la defensa del estrés nitrosativo y la versatilidad en mecanismos de reacción de las flavoproteínas (Nishimura *et al.*, 2013). Tal vez, una de las tantas razones para esta versatilidad obtenida de las flavoproteínas puede ser gracias a la fisicoquímica de su grupo hemo, que en su estado reductivo pueden unirse a radicales libres y otros gases orgánicos (Bjorck *et al.*, 2017).

Con la sulfenilación se puede hacer una gran comparación, y entablar una clara diferencia del estrés oxidativo y nitrosativo a nivel general, rompiendo el estigma

de lo que se esperaba, observar más sulfenilación en mutantes que acumulan RNS, ahora sabemos que no hay sinergia entre ambas (figura 6.11). Aunado a esto, existe la gran crítica de Wolhouter y col en 2018 la cual derrumba la nitrosilación como marca postraducciona, estable y general que denota en un paisaje postraducciona y la establecen como una marca transitoria del estrés nitrosativo por su fisicoquímica efímera que siempre termina en un enlace disulfuro y al final cae dentro de las modificaciones oxidantes (MPox), suponemos que es lo que podríamos estar viendo en este carril.

Por último, es importante recalcar la influencia de otras enzimas conocidas como NOX, la cuales están tomando terreno en la producción de H₂O₂ a través de la dismutación del anión superóxido, en un contexto fisiológico más específico de otros organismos, como en la nodulación temprana de la simbiosis de Leguminosa perteneciente al género *Rhizobium* se han reportado proteínas S-sulfeniladas y S-nitrosiladas (Puppo *et al.*, 2013). Otro proceso biológico que nos llamó la atención es la enfermedad de tensión de cizallamiento laminar (LSS, en inglés), ya que, el fundamento molecular se debe a diferencias en el paisaje postraducciona donde justamente participa NOX4 promoviendo la sulfenilación de la fosfatasa SHP2 y la posterior activación de eNOS que resultan en ateroprotección y vasodilatación (Sánchez *et al.*, 2015). La evidencia nos muestra la armonía en el efecto y producción de ambos radicales y regulándose a sí mismos en contextos muy específicos, de cierta forma también podemos visualizar la nitrosilación como una marca específica-transitoria y la sulfenilación como una marca general y más estable como en nuestro caso (Stomberski y Stamler, 2019). Concluimos, así como Foster en el 2009, que en levadura la generación de ROS por acumulación de H₂O₂ no favorece la nitrosilación, en un futuro habría que tomarse en cuenta la comparación de ambas marcas postraduccionales y enfocarlas hacia la conservación evolutiva del fundamento molecular (Altaany *et al.*, 2014).

8. CONCLUSIONES

Se construyeron y confirmaron cepas mutantes para cada gen: *YGR234W (YHB1)*, *YDL168W (SFA1)*, *YDR256C (CTA1)* Y *YGR088W (CTT1)*. De estas mutantes sencillas se les mutó otro gen para construir y confirmar cepas dobles mutantes de cuatro genes $\Delta cta1:\Delta ctt1$ y $\Delta sfa1:\Delta yhb1$.

Se purificaron y marcaron proteínas persulfuradas, sulfeniladas en fase exponencial de las dos mutantes mostrando diferencias en la señal del WB del paisaje postraduccional general. La señal de proteínas sulfeniladas en estado exponencial de $\Delta cta1:\Delta ctt1$ no tuvo algún cambio preponderante con el control, por su parte, la cepa $\Delta sfa1:\Delta yhb1$ sí hubo un decremento considerable con respecto al control. En cuanto a la señal de proteínas persulfuradas en fase exponencial de $\Delta cta1:\Delta ctt1$ no mostraron algún cambio considerable con respecto al control, por su parte, la cepa $\Delta sfa1:\Delta yhb1$ sí tuvo un decremento considerable en cuanto al control.

Concluimos que el generar estos modelos genéticos en levadura son indispensables para recapitular el ambiente celular en estrés y más en específico para estudiar la función enigmática de las cisteínas de sitios relevantes para su estructura-función de proteínas.

8.1 Perspectivas

Tenemos como misión a largo plazo encontrar candidatos proteicos, principalmente, cinasas con cisteínas prospecto para ser reguladas por sulfenilación, nitrosilación y persulfuración en las dobles mutantes $\Delta sfa1,\Delta yhb1$ y $\Delta cta1,\Delta ctt1$. Además de buscar candidatos proteicos que regulen la expresión de otros con la finalidad de entender más a fondo el significado biológico de la interacción de modificaciones postraduccionales en condiciones de estrés nitrosativo y oxidativo.

9. REFERENCIAS

Abe, K., & Kimura, H. (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *Journal of Neuroscience*, 16(3), 1066-1071.

Altaany, Z., Ju, Y. J., Yang, G., & Wang, R. (2014). The coordination of S-sulfhydration, S-nitrosylation, and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide. *Science Signaling*, 7(342), 1–10.

Almeida, B., Buttner, S., Ohlmeier, S., Silva, A., Mesquita, A., Sampaio-Marques, B., ... & Ludovico, P. (2007). NO-mediated apoptosis in yeast. *Journal of Cell Science*, 120(18), 3279-3288.

Anand, P., Hausladen, A., Wang, Y. J., Zhang, G. F., Stomberski, C., Brunengraber, H., Hess, D. T., & Stamler, J. S. (2014). Identification of S-nitroso-CoA reductases that regulate protein S-nitrosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(52), 18572–18577.

Astuti, R. I., Watanabe, D., & Takagi, H. (2016). Nitric oxide signaling and its role in oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 52.

Björck, M. L., Zhou, S., Rydström Lundin, C., Ott, M., Ädelroth, P., & Brzezinski, P. (2017). Reaction of *S. cerevisiae* mitochondria with ligands: Kinetics of CO and O₂ binding to flavohemoglobin and cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1858(2), 182–188.

Braunstein, I., Engelman, R., Yitzhaki, O., Ziv, T., Galardon, E., & Benhar, M. (2020). Opposing effects of polysulfides and thioredoxin on apoptosis through caspase persulfidation. *Journal of Biological Chemistry*, 295(11), 3590–3600.

Bucci, M.; Papapetropoulos, A.; Vellecco, V.; Zhou, Z.; Pyriochou, A.; Roussos, C.; Roviezzo, F.; Brancaleone, V.; Cirino, G. (2010). Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30, 1998–2004.

Bucci, M.; Papapetropoulos, A.; Vellecco, V.; Zhou, Z.; Zaid, A.; Giannogonas, P.; Cantalupo, A.; Dhayade, S.; Karalis, K.P.; Wang, R.; et al. cGMP-dependent protein kinase contributes to hydrogen sulfide-stimulated vasorelaxation. *PLoS ONE* 2012

Cassanova, N., O'Brien, K. M., Stahl, B. T., McClure, T., & Poyton, R. O. (2005). Yeast flavohemoglobin, a nitric oxide oxidoreductase, is located in both the cytosol and the mitochondrial matrix: Effects of respiration, anoxia, and the mitochondrial genome on its intracellular level and distribution. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 7645–7653.

Chen, Z., Xia, Y., Liu, H., Liu, H., & Xun, L. (2021). The mechanisms of thiosulfate toxicity against *Saccharomyces cerevisiae*. *Antioxidants*, 10(5).

Cho D-HH, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, and Lipton SA. S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science*, (80-) 324: 102-105, 2009.

Coletta, C., Papapetropoulos, A., Erdelyi, K., Olah, G., Módis, K., Panopoulos, P., & Szabo, C. (2012). Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(23), 9161-9166.

Cortese-Krott, M. M., Kuhnle, G. G. C., Dyson, A., Fernandez, B. O., Grman, M., DuMond, J. F., Barrow, M. P., McLeod, G., Nakagawa, H., Ondrias, K., Nagy, P., King, S. B., Saavedra, J. E., Keefer, L. K., Singer, M., Kelm, M., Butler, A. R., & Feelisch, M. (2015). Key bioactive reaction products of the NO/H₂S interaction are S/N-hybrid species, polysulfides, and nitroxyl. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(34), E4651–E4660.

Dóka, 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).

Domitrovic, T., Palhano, F. L., Barja-Fidalgo, C., DeFreitas, M., Orlando, M. T. D., & Fernandes, P. M. B. (2003). Role of nitric oxide in the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to heat shock and high hydrostatic pressure. *FEMS Yeast Research*, 3(4), 341–346.

Eberhardt, M., Dux, M., Namer, B., Miljkovic, J., Cordasic, N., Will, C., Kichko, T. I., De La Roche, J., Fischer, M., Suárez, S. A., Bikiel, D., Dorsch, K., Leffler, A., Babes, A., Lampert, A., Lennerz, J. K., Jacobi, J., Martí, M. A., Doctorovich, F., Filipovic, M. R. (2014). H₂S and NO cooperatively regulate vascular tone by

activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Nature Communications*, 5.

Filipovic, M. R., Miljkovic, J. L., Nauser, T., Royzen, M., Klos, K., Shubina, T., ... & Ivanović-Burmazović, I. (2012). Chemical characterization of the smallest S-nitrosothiol, HSNO; cellular cross-talk of H₂S and S-nitrosothiols. *Journal of the American Chemical Society*, 134(29), 12016-12027.

Filipovic, M. R., Miljkovic, J., Allgäuer, A., Chaurio, R., Shubina, T., Herrmann, M., & Ivanovic-Burmazovic, I. (2012). Biochemical insight into physiological effects of H₂S: reaction with peroxynitrite and formation of a new nitric oxide donor, sulfinyl nitrite. *Biochemical Journal*, 441(2), 609-621.

Foster, M. W., Forrester, M. T., & Stamler, J. S. (2009). A protein microarray-based analysis of S-nitrosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45), 18948-18953.

Foster, M. W., Liu, L., Zeng, M., Hess, D. T., & Stamler, J. S. (2009). A genetic analysis of nitrosative stress. *Biochemistry*, 48(4), 792–799.

Gould, N. S., Evans, P., Martinez-acedo, P., Marino, S. M., Vadim, N., Carroll, K. S., & Ischiropoulos, H. (2016). *Cell Journal*. 22(7), 965–975.

Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radicals and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 288-300.

Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S. O., Marshall, H. E., & Stamler, J. S. (2005). Protein S-nitrosylation: Purview and parameters. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(2), 150–166.

Hourihan, J. M., Moronetti Mazzeo, L. E., Fernández-Cárdenas, L. P., & Blackwell, T. K. (2016). Cysteine Sulfenylation Directs IRE-1 to Activate the SKN-1/Nrf2 Antioxidant Response. *Molecular Cell*, 63(4), 553–566.

Huang, C. W., & Moore, P. K. (2015). H₂S synthesizing enzymes: Biochemistry and molecular aspects. In *Handbook of Experimental Pharmacology*. 230(Cap 1).10-35.

Ivanovic-Burmazovic, I., & Filipovic, M. R. (2019). Saying NO to H₂S: A Story of HNO, HSNO, and SSNO -. *Inorganic Chemistry*, 58(7), 4039–4051.

Jang, J. Y., Hong, Y. J., Lim, J., Choi, J. S., Choi, E. H., Kang, S., & Rhim, H. (2018). Cold atmospheric plasma (CAP), a novel physicochemical source, induces neural differentiation through cross-talk between the specific RONS cascade and Trk/Ras/ERK signaling pathway. *Biomaterials*, 156.

Kim, I. S., Moon, H. Y., Yun, H. S., & Jin, I. N. (2006). Heat shock causes oxidative stress and induces a variety of cell rescue proteins in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *Journal of Microbiology*, 44(5), 492-501.

Kimura H, Nagai Y, Umemura K, Kimura Y. (2005). Physiological roles of hydrogen sulfide: synaptic modulation, neuroprotection, and smooth muscle relaxation. *Antioxidants Redox Signal*, 7, 795–803

King, A. L., Polhemus, D. J., Bhushan, S., Otsuka, H., Kondo, K., Nicholson, C. K., Bradley, J. M., Islam, K. N., Calvert, J. W., Tao, Y. X., Dugas, T. R., Kelley, E. E., Elrod, J. W., Huang, P. L., Wang, R., & Lefer, D. J. (2014). Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(8), 3182–3187.

Liu, L., Zeng, M., Hausladen, A., Heitman, J., & Stamler, J. S. (2000). Protection from nitrosative stress by yeast flavohemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), 4672–4676.

Liu, W. C., Yuan, H. M., Li, Y. H., & Lu, Y. T. (2015). CKA2 functions in H₂O₂-induced apoptosis and high-temperature stress tolerance by regulating NO accumulation in yeast. *FEMS Yeast Research*, 15(6), 1–6.

Majumdar, U., Biswas, P., Subhra Sarkar, T., Maiti, D., & Ghosh, S. (2012). Regulation of cell cycle and stress responses under nitrosative stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(11–12), 2186–2200.

Marozkina, N., & Gaston, B. (2020). An update on thiol signaling: S-nitrosothiols, hydrogen sulfide and a putative role for thionitrous acid. *Antioxidants*, 9(3), 1–11.

Miljkovic, J. L., Kenkel, I., Ivanovič-Burmazovič, I., & Filipovic, M. R. (2013). Generation of HNO and HSNO from nitrite by heme-iron-catalyzed metabolism with H₂S. *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(46), 12061–12064.

Miyamoto, R., Koike, S., Takano, Y., Shibuya, N., Kimura, Y., Hanaoka, K., Urano, Y., Ogasawara, Y., & Kimura, H. (2017). Polysulfides (H₂Sn) produced from the interaction of hydrogen sulfide (H₂S) and nitric oxide (NO) activate TRPA1 channels. *Scientific Reports*, 7(April), 1–10.

Montagna, C., Cirotti, C., Rizza, S., & Filomeni, G. (2020). When S-Nitrosylation gets to mitochondria: From signaling to age-related diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*, 32(12), 884–905.

Nishimoto, T., Watanabe, T., Furuta, M., Kataoka, M., & Kishida, M. (2016). Roles of catalase and trehalose in the protection from hydrogen peroxide toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biocontrol Science*, 21(3), 179-182.

Nishimura, A., Kawahara, N., & Takagi, H. (2013). The flavoprotein Tah18-dependent NO synthesis confers high-temperature stress tolerance on yeast cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(1), 137–143.

Paul, B. D., Sbodio, J. I., & Snyder, S. H. (2018). Cysteine Metabolism in Neuronal Redox Homeostasis. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(5), 513–524.

Paulsen, C. E., & Carroll, K. S. (2013). Cysteine-mediated redox signaling: Chemistry, biology, and tools for discovery. *Chemical Reviews*, 113(7), 4633–4679.

Puppo, A., Pauly, N., Boscari, A., Mandon, K., & Brouquisse, R. (2013). Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the legume—rhizobium and mycorrhizal symbioses. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(16), 2202-2219.

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, 1–32.

Sánchez-Gómez, F. J., Calvo, E., Bretón-Romero, R., Fierro-Fernández, M., Anilkumar, N., Shah, A. M., & Lamas, S. (2015). NOX4-dependent hydrogen peroxide promotes shear stress-induced SHP2 sulfenylation and eNOS activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 419-430.

Schmeisser, S., Zarse, K., & Ristow, M. (2011). Lonidamine extends lifespan of adult *Caenorhabditis elegans* by increasing the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Hormone and Metabolic Research*, 43(10), 687-692.

Seth, D., Hess, D. T., Hausladen, A., Wang, L., Wang, Y. Juan, & Stamler, J. S. (2018). A Multiplex Enzymatic Machinery for Cellular Protein S-nitrosylation. *Molecular Cell*, 69(3), 451-464.e6.

Seth, P., Hsieh, P. N., Jamal, S., Wang, L., Gygi, S. P., Jain, M. K., Collier, J., & Stamler, J. S. (2019). Regulation of MicroRNA Machinery and Development by Interspecies S-Nitrosylation. *Cell*, 176(5), 1014-1025.e12.

Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. In *Methods in enzymology* (Vol. 350, pp. 3-41). Academic Press.

Shoman, M. E., & Aly, O. M. (2016). Nitroxyl (HNO): a reduced form of nitric oxide with distinct chemical, pharmacological, and therapeutic properties. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

Stomberski, C. T., Hess, D. T., & Stamler, J. S. (2019). Protein S-Nitrosylation: Determinants of Specificity and Enzymatic Regulation of S-Nitrosothiol-Based Signaling. *Antioxidants and Redox Signaling*, 30(10), 1331–1351.

Szjártó, I. A., Markó, L., Filipovic, M. R., Miljkovic, J. L., Tabeling, C., Tsvetkov, D., Wang, N., Rabelo, L. A., Witzenrath, M., Diedrich, A., Tank, J., Akahoshi, N., Kamata, S., Ishii, I., & Gollasch, M. (2018). Cystathionine γ -lyase-produced hydrogen sulfide controls endothelial NO bioavailability and blood pressure. *Hypertension*, 71(6), 1210–1217.

Wages, P. A., Lavrich, K. S., Zhang, Z., Cheng, W. Y., Corteselli, E., Gold, A., ... & Samet, J. M. (2015). Protein sulfenylation: a novel readout of environmental oxidant stress. *Chemical research in toxicology*, 28(12), 2411-2418.

Wedmann, R., Ivanovic-Burmazovic, I., & Filipovic, M. R. (2017). Nitrosopersulfide (SSNO⁻) decomposes in the presence of sulfide, cyanide or glutathione to give HSNO/SNO⁻: Consequences for the assumed role in cell signalling. *Interface Focus*, 7(2).

Wedmann, R., Onderka, C., Wei, S., Szjártó, I. A., Miljkovic, J. L., Mitrovic, A., Lange, M., Savitsky, S., Yadav, P. K., Torregrossa, R., Harrer, E. G., Harrer, T., Ishii, I., Gollasch, M., Wood, M. E., Galardon, E., Xian, M., Whiteman, M., Banerjee, R., & Filipovic, M. R. (2016). Improved tag-switch method reveals that thioredoxin acts as depersulfidase and controls the intracellular levels of protein persulfidation. *Chemical Science*, 7(5), 3414–3426.

Whiteman M, Li L, Kostetski I, Chu SH, Siau JL, Bhatia M, Moore PK. (2006). Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343, 303–310.

Wolhuter, K., Whitwell, H. J., Switzer, C. H., Burgoyne, J. R., Timms, J. F., & Eaton, P. (2018). Evidence against Stable Protein S-Nitrosylation as a Widespread Mechanism of Post-translational Regulation. *Molecular Cell*, 69(3), 438-450.e5.

Xie, Z. Z., Shi, M. M., Xie, L., Wu, Z. Y., Li, G., Hua, F., & Bian, J. S. (2014). Sulfhydration of p66Shc at Cysteine59 mediates the antioxidant effect of hydrogen sulfide. *Antioxidants and Redox Signaling*, 21(18), 2531–2542.

Yoshikawa, Y., Nasuno, R., Kawahara, N., Nishimura, A., Watanabe, D., & Takagi, H. (2016). Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 57, 85–91.

Zimmermann, J., Oestreicher, J., Hess, S., Herrmann, J. M., Deponte, M., & Morgan, B. (2020). One cysteine is enough: A monothiol Grx can functionally replace all cytosolic Trx and dithiol Grx. *Redox Biology*, 36(May), 101598.

Zivanovic, J., Kouroussis, E., Kohl, J. B., Adhikari, B., Bursac, B., Schott-Roux, S., Petrovic, D., Miljkovic, J. L., Thomas-Lopez, D., Jung, Y., Miler, M., Mitchell, S., Milosevic, V., Gomes, J. E., Benhar, M., Gonzales-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.

10. ANEXOS

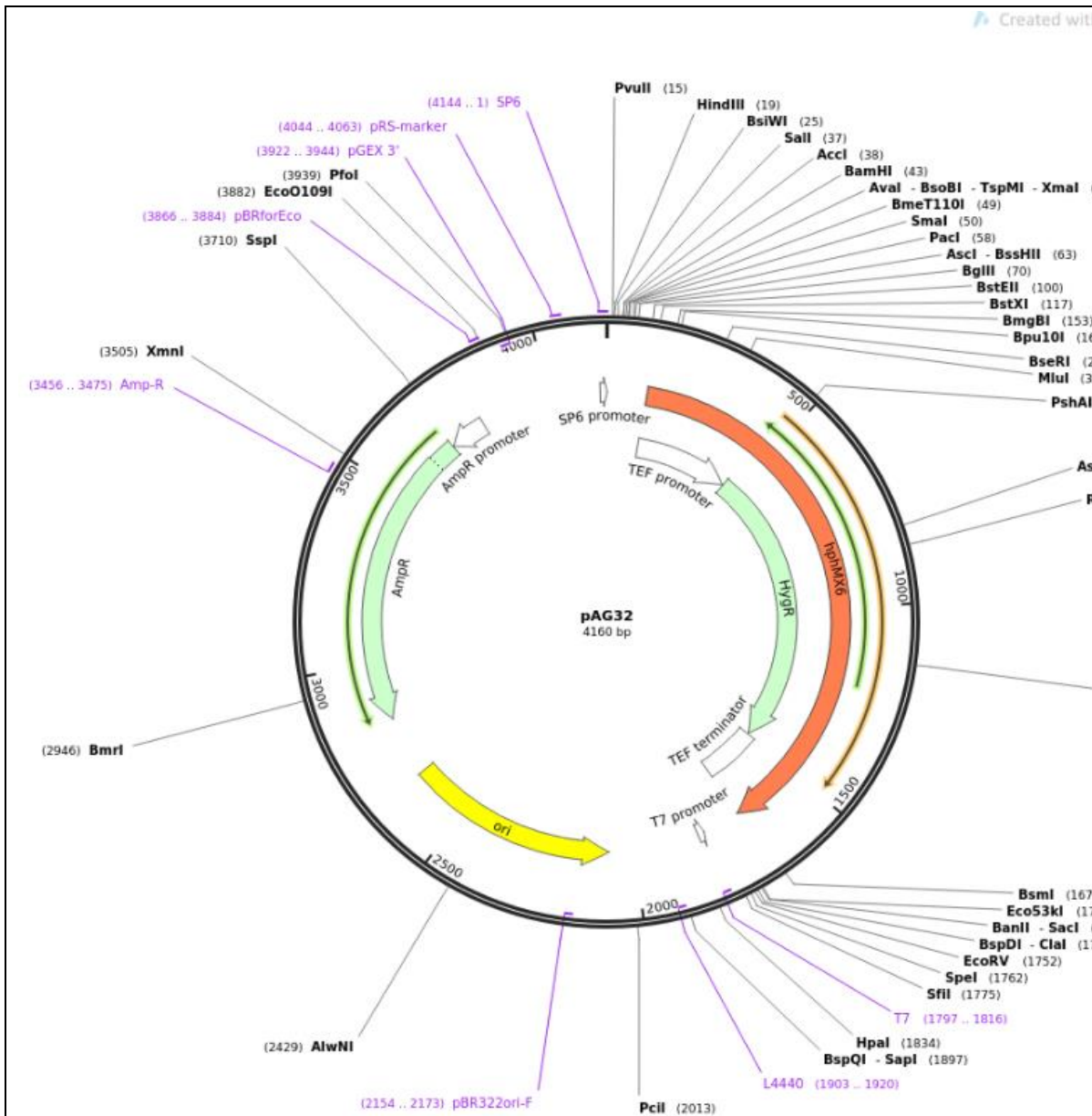


Figura 10.1 Mapa genético del plásmido pAG32

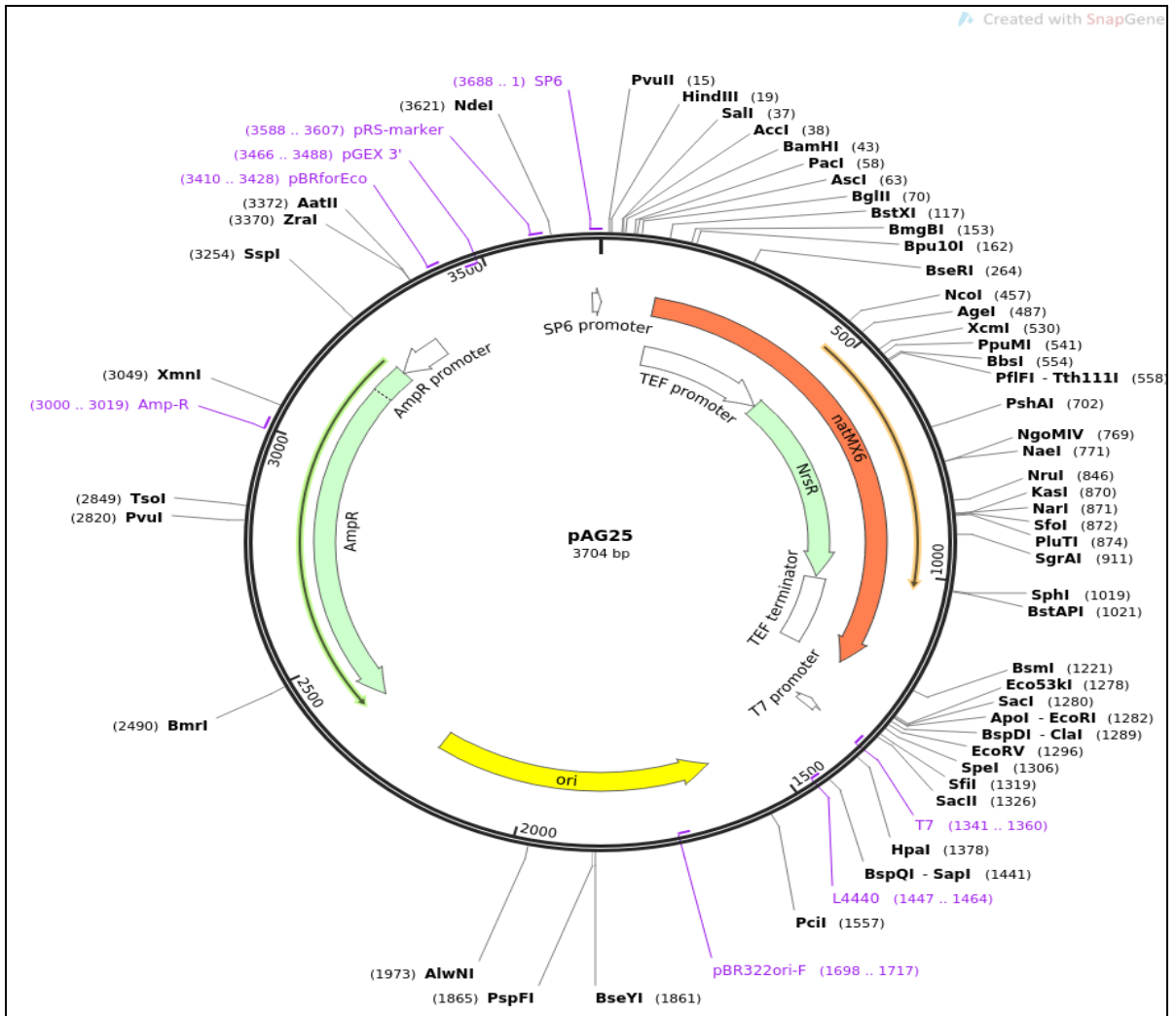


Figura 10.2 Mapa Genético del plásmido pAG25.

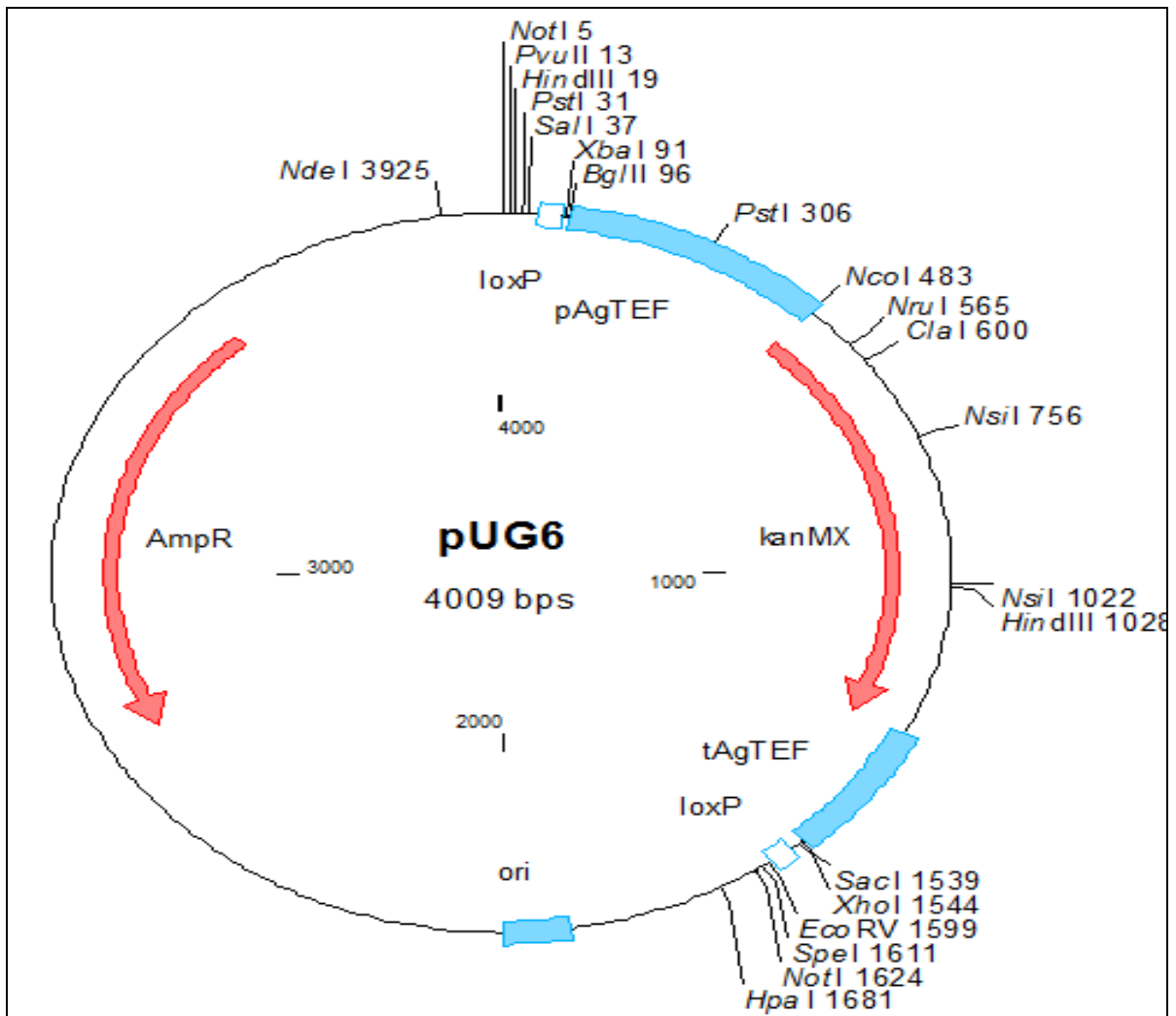


Figura 10.3 Mapa genético del plásmido pUG6.

