



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**PROGRAMA DE DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA
Y ENZIMÁTICA DE UNA CATALASA-
PEROXIDASA DE *Neurospora crassa***

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS PRESENTA
CARLOS LEONARDO PERAZA REYES

CON LA DIRECCIÓN DE:
DR. WILHELM HANSBERG TORRES

SEPTIEMBRE 2005



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.

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Wilhelm Hansberg Torres en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México con el apoyo de las subvenciones 25288N, 33148N, C01-40697 de CONACyT y IN214199, IN225402, IN228405 de DGAPA/PAPIIT. Durante el proyecto doctoral, Leonardo Peraza recibió una beca del CONACyT, una beca complementaria de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la UNAM y dos donativos otorgados por el Programa de Apoyo de Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM.

A Floria, a mi bella Floria, por su pasión.
A mi Mamá y a mi Papá por hacer de mí un hombre
de ciencia. A mi hermano por su ejemplo y su
cariño. A mis abuelos, a mis tíos y a mis primos,
por su amor. A Vladimir, por tantos años. A
Mariana y Fernando, a Maribel, a Gala y Cris, a
Javier y Fernanda. A mis suegros queridos. A
Rodolfo, Juan Manuel, Hilda, Adelaida, María,
Selva y José Luis, por su amistad.

Agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Wilhelm Hansberg por todo su apoyo y por ser un gran ejemplo de un científico íntegro.

A los Drs. Diego González Halphen y Roberto Hernández Fernández por su dedicación, por la discusión constante de mi proyecto y por contagiarme su pasión por la ciencia.

Al Dr. Jesús Aguirre, por siempre ampliar mi visión científica.

A los integrantes de la Unidad de Cómputo y a la Unidad de Biología Molecular del Instituto por su apoyo y excelente trabajo. A Mark West y Jorge Sepúlveda de la Unidad de Microscopía del Instituto por su ayuda con los experimentos de *HPLC* y por sus magníficas micrografías electrónicas.

A los integrantes de mi jurado de examen, Dra. María Del Carmen Gómez Eichelmann, Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara, Dr. Diego González Halphen, Dr. Wilhelm Hansberg Torres, Dr. Roberto Hernández Fernández, Dr. Luis Servín González y Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por su cuidadosa revisión de este trabajo.

A Floria Lizárraga y Rodolfo Salas por su colaboración en la realización y discusión de este trabajo. A Rodolfo por su valiosa ayuda con los análisis filogenéticos.

A los miembros de mi examen de candidatura, Dr. Armando Gómez Puyou, Dr. Enrique Piña Garza, Dra. Alejandra Covarrubias Robles, Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos, Dra. Rosario Muñoz Clares, Dr. Roberto Hernández Fernández y Dr. Félix Recillas Targa.

A todas las personas del Instituto de Fisiología Celular, del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y del Instituto Nacional de Cancerología que de alguna manera participaron en este trabajo. Muy especialmente a Adelaida Díaz, Lenin Domínguez, Teresa Lara, Karen Álvarez, Laura Kawasaki, Vanessa Vega, María Chávez, Julián Valdés, Pablo Rangel, Alejandro Flores, Mauricio Rios, Shaday Michán, Fernando Lledías, Abraham Vidal, Olivia Sánchez, Nallely Cano, Yésika Montes de Oca, Gabriela Soid, José Luis Ramos, Viviana Zomoza y Lina Riego.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	
La diferenciación celular	1
La diferenciación celular en <i>Neurospora crassa</i>	2
La teoría de la evasión del dióxígeno para la diferenciación celular	4
Las especies reactivas del oxígeno y la respuesta antioxidante	5
Las catalasas	8
Las peroxidasas	9
Las catalasa-peroxidasas	10
ANTECEDENTES	15
La respuesta antioxidante en los hongos	15
Las catalasa-peroxidasas en los hongos	16
OBJETIVOS	17
MATERIAL Y MÉTODOS	18
RESULTADOS	
LA PROTEÍNA	
La purificación de la CAT-2 de <i>Neurospora crassa</i>	25
El grupo prostético de la CAT-2	26
Las actividades catalíticas de la CAT-2	27
La actividad de la CAT-2 en función del pH	30
La inhibición de la CAT-2	30
Secuenciación de un peptido interno de la CAT-2	32
EL GEN	
La clonación del ADNc <i>cat-2</i>	33
La estructura del gen <i>cat-2</i>	33
EL ORIGEN DEL GEN <i>cat-2</i>	36
LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA CAT-2	
Fraccionamiento celular de <i>Neurospora crassa</i>	40
LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA CAT-2	
La regulación de la expresión de la CAT-2 durante el crecimiento	44
La regulación de la CAT-2 durante diferentes condiciones de tensión	45
La regulación de la expresión de la CAT-2 durante el desarrollo asexual	46

La regulación de la expresión de la CAT-2 durante el desarrollo sexual	48
LA FISIOLÓGÍA DE <i>N. crassa</i> EN AUSENCIA DE LA CAT-2	
La generación de las cepas carentes de CAT-2	50
La caracterización de las cepas carentes de CAT-2	54
El crecimiento de las cepas <i>cat-2^{RIP}</i>	56
Las cepas <i>cat-2^{RIP}</i> y el estrés	56
La conidiación de las cepas <i>cat-2^{RIP}</i>	58
La formación de peritecios durante el desarrollo sexual de las cepas <i>cat-2^{RIP}</i>	62
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	
La CAT-2 de <i>N. crassa</i> es una catalasa-peroxidasa	65
La estructura del gen <i>cat-2</i> y de la enzima	65
Propiedades catalíticas de la enzima	71
Las catalasa-peroxidases de los hongos tienen un origen procarioto	74
La CAT-2 es una enzima citosólica	76
La función de la CAT-2	78
La CAT-2 se regula durante el desarrollo y modula la conidiación sumergida	81
APÉNDICES	
APÉNDICE 1	84
APÉNDICE 2	86
APÉNDICE 3	88
La caracterización de las cepas <i>cat-2^{RIP(F2)}</i>	88
Las cepas <i>cat-2^{RIP(F2)}</i> son sensibles al calor	89
Las cepas <i>cat-2^{RIP(F2)}</i> son sensibles a los hidroperóxidos	90
La conidiación de las cepas <i>cat-2^{RIP(F2)}</i> en metanol es cíclica	91
La formación de peritecios durante el desarrollo sexual de las cepas <i>cat-2^{RIP(F2)}</i>	92
APÉNDICE 4	97
Publicación: Peraza, L. & W. Hansberg (2002). <i>Neurospora crassa</i> catalases, singlet oxygen and cell differentiation. <i>Biological Chemistry</i> 383:569-75.	97
REFERENCIAS	104

INTRODUCCIÓN

La diferenciación celular

La diferenciación celular tradicionalmente se ha visto como un proceso mediante el cual se generan tipos celulares especializados que difieren en su estructura y función (Alberts *et al.*, 2002). En términos generales, se piensa que es un proceso secuencial e irreversible que depende de cambios en la expresión génica de modo jerárquico, de manera que determinados genes reguladores activan a otros que a su vez pueden ser reguladores o efectores y así, sucesivamente, se establece un patrón que compromete a la célula a asumir cierto linaje y que culmina con un estado diferenciado. Es de llamar la atención el carácter tautológico de esta visión y la falta de una explicación que manifieste por qué se expresan genes diferentes. Si bien, está claro que para que ocurra la diferenciación celular se requiere una activación y regulación de genes específicos, no está claro qué es lo que inicia dicha activación o qué es lo que tienen en común los diferentes estímulos capaces de desencadenar los diferentes procesos de diferenciación celular. Algunos modelos suponen que el evento inicial es estocástico (Kupiec, 1997; Paldi, 2003).

Otra alternativa ha sido considerar a la diferenciación celular como una transición entre estados estables. Siendo estables el crecimiento (o proliferación celular) y los estados diferenciados, la transición entre ellos plausiblemente es inestable. Así, al entender qué genera (o caracteriza) dicha inestabilidad, es posible conocer cuales son los eventos iniciales en las transiciones morfogénicas celulares (Hansberg y Aguirre, 1990; Hansberg, 1996). En el laboratorio nos hemos enfocado en determinar la existencia de dicho estado inestable, en definir sus características y en entender la respuesta de la célula ante dicho estado. Para ello estudiamos los procesos de diferenciación celular de los hongos.

Los hongos resultan organismos atractivos para estudiar cómo se determinan y regulan los procesos de diferenciación celular. Éstos presentan vías alternas de esporulación tanto sexuales como asexuales que, dada la totipotencialidad de su micelio, no son vitales y se pueden manipular. Los procesos de diferenciación celular de algunos hongos, como *Neurospora crassa*, son rápidos, se pueden inducir de manera sincrónica y se pueden separar los estadios diferenciados para su análisis. Por otra parte, en *N. crassa* se cuenta con un gran número de mutantes caracterizadas, así como con la metodología para hacer genética tanto tradicional como molecular. Asimismo, su genoma ha sido secuenciado y la información resultante ha sido organizada (Davis y Perkins, 2002; Galagan *et al.*, 2003).

La diferenciación celular en *Neurospora crassa*

Los hongos son organismos cuyo desarrollo presenta varias vías alternas de propagación y reproducción. La mayor parte de ellas conlleva procesos de diferenciación celular que culminan con la formación de esporas que pueden ser de origen sexual o asexual. En los hongos ascomicetos, como *N. crassa*, las esporas sexuales (ascosporas) son haploides y se forman dentro de células especializadas (esporangios) llamadas ascas como resultado de la meiosis. Las células (ó hifas) somáticas también son haploides y las esporas asexuales (conidios) se forman mitóticamente a partir de las hifas de manera exógena. En *N. crassa* se pueden formar dos tipos de conidios: los macroconidios y los microconidios. El proceso de esporulación más conspicuo del hongo es la formación de los macroconidios. Este proceso se caracteriza por la formación de hifas aéreas (conidióforos) que emergen a partir del micelio adherido (del sustrato) (Toledo *et al.*, 1986). Los macroconidios son esporas multinucleadas que a su vez, dependiendo de su origen, pueden ser blastoconidios o arthroconidios. Su formación comienza por la aparición de una serie de constricciones menores en las hifas aéreas, seguida por la formación de cadenas proconidiales que se generan por gemación sucesiva en los ápices hifales. Las células de las cadenas proconidiales son delimitadas por constricciones mayores cuya separación tiene como resultado la formación de los blastoconidios. Por otra parte, la formación de septos en las constricciones menores de los conidióforos y la desarticulación de las células delimitadas por ellos dan lugar a los arthroconidios (Springer, 1993). Los microconidios, por su parte, son esporas blásticas pero de menor dimensión que los macroconidios y son uninucleadas. Se forman individualmente a partir de microconidióforos (Maheshwari, 1991; Springer, 1993; Maheshwari, 1999).

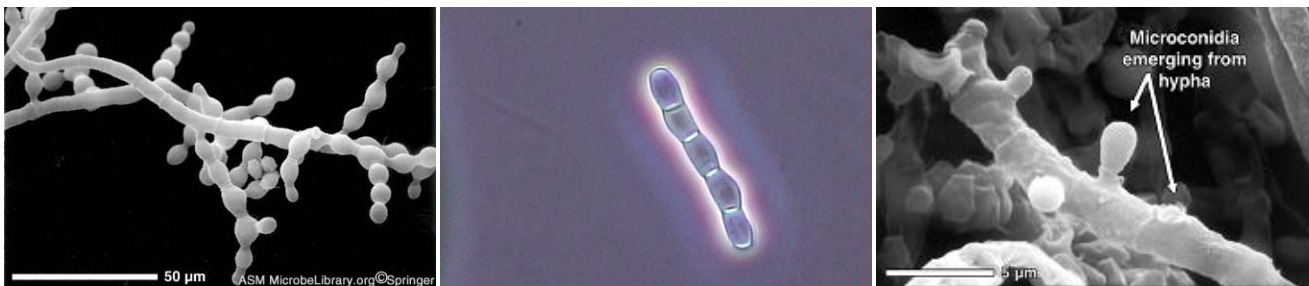


Figura 1. Las esporas asexuales de *N. crassa*: blastoconidios, arthroconidios y microconidios (de izquierda a derecha).

El proceso de conidiación del hongo se puede inducir por varios estímulos, tales como la exposición al aire y la luz (Davis, 2000). Asimismo, se sabe que la privación de carbono o nitrógeno puede inducir la formación de conidios aún en cultivos sumergidos (Muller y Russo, 1989). En determinadas condiciones, el desarrollo asexual de *N. crassa* se caracteriza por zonas de conidiación intensa y zonas de escasa conidiación. Como resultado, las colonias del hongo presentan un patrón concéntrico de bandas de conidiación (Fig. 2A) o de bandas paralelas si el crecimiento se hace en cultivos en pista (Fig. 2B). Este patrón es evidente en algunas cepas mutantes, como la cepa *band (bd)*, en las que los periodos de máxima conidiación suelen ocurrir en intervalos de 22 horas. Este ritmo de conidiación presenta otras características consideradas como propias de los ritmos circadianos: una vez presente el ritmo éste se sostiene por muchos días, presenta una compensación por temperatura y se puede sincronizar por estímulos tales como la luz y la temperatura. Por ello, se ha planteado que la conidiación del hongo es circadiana y se ha propuesto que el ritmo se mantiene mediante un mecanismo oscilador auto-regulado compuesto por elementos positivos que lo estimulan y negativos que forman un asa de retroalimentación negativa (Davis, 2000; Liu, 2003).

La reproducción sexual de *N. crassa* es un proceso complejo que ocurre en cuerpos fructíferos multi-hifales (ascomas) llamados peritecios (Fig. 3B y C). Este proceso requiere la formación de múltiples tipos celulares. *N. crassa* es un hongo heterotálico en el cual la reproducción sexual ocurre sólo entre individuos de sexo distinto. Los individuos de ambos sexos son capaces de formar estructuras sexuales receptoras (el ascogonio o parte femenina, Fig. 3A) y células donadoras (masculinas). El ascogonio está inmerso en un protoperitecio formado por hifas haploides de la cepa receptora y puede ser fertilizado por un conidio o un fragmento hifal del sexo opuesto. Una vez que esto ocurre se desarrolla el peritecio y en su interior se propagan las células ascógenas (dicariontes) que darán lugar a las ascas y a las ascosporas (Fig. 3 D y E). En *N. crassa* la cariogamia es seguida por la meiosis y por una división mitótica de manera que por cada célula ascógena se forma un asca con ocho ascosporas haploides (Springer, 1993; Coppin *et al.*, 1997).

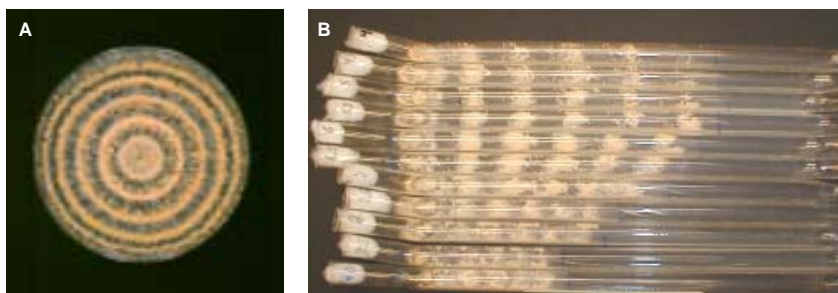


Figura 2. Las conidiación circadiana de *N. crassa* en colonias concéntricas (A) o en tubos (B).

Los genes que determinan el sexo están localizados en un locus (*mat*) del que existen dos versiones alternativas (*mat A* y *mat a*) que son polimórficas y son llamadas ideomorfos. El locus *mat a* contiene un solo gen (*mat a-1*) mientras que el *mat A* incluye tres genes (*mat A-1*, *mat A-2* y *mat A-3*). Se sabe que, además de controlar la reproducción sexual, los genes *mat a-1* y *mat A-1* controlan la compatibilidad vegetativa (Coppin *et al.*, 1997).

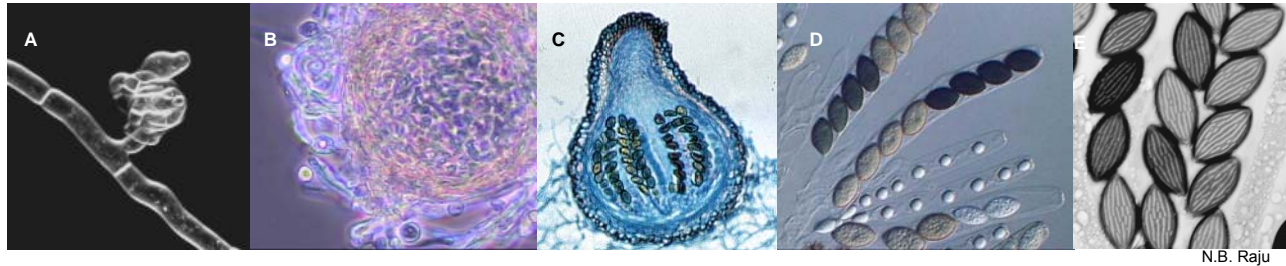


Figura 3. El desarrollo sexual en *N. crassa*. Ascogonio (A), protoperitecio (B), peritecio (C), ascas (D) y ascosporas (E).

La teoría de la evasión del oxígeno para la diferenciación celular

La conidiación del hongo se puede inducir de manera sincrónica al exponer al aire el micelio del hongo que ha crecido en medio líquido. Durante este proceso se pueden observar tres transiciones morfogénicas: la adhesión de las hifas que ocurre durante los primeros 40 minutos de la exposición al aire, la formación del micelio aéreo que comienza después de dos horas y la formación de los conidios que ocurre entre nueve y diez horas después de exponer al aire el micelio. La caracterización de estas transiciones morfogénicas ha revelado que cada estado diferenciado es precedido por un estado hiperoxidante (Hansberg y Aguirre, 1990; Hansberg, 1996).

El inicio de cada transición morfogénica se caracteriza por un incremento en la oxidación y la degradación de la proteína total (Toledo *et al.*, 1994). Enzimas como la glutamato deshidrogenasa biosintética (dependiente de NADP^+) desaparecen rápidamente al inicio de la conidiación y otras como la glutamina sintetasa se inactivan al inicio de cada cambio morfogénico y se vuelven a sintetizar en los estados diferenciados. Se ha demostrado que la pérdida de estas actividades está relacionada con su oxidación lo que las hace más susceptibles a la proteólisis (Aguirre y Hansberg, 1986; Aguirre *et al.*, 1989; Toledo *et al.*, 1994). Hay otras enzimas, como las catalasas, que también son oxidadas durante la conidiación pero que no parecen ser inactivadas como consecuencia (Michán *et al.*, 2002).

Por otra parte, al mismo tiempo que se oxidan las enzimas y la proteína total, se detecta un desequilibrio en el estado redox de los principales acarreadores de electrones. Los niveles

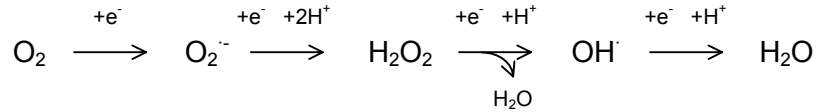
de NADH y NADPH decaen rápidamente y simultáneamente aumentan los de NAD^+ y NADP^+ . La concentración del glutatión disminuye mientras que el disulfuro de glutatión es excretado (Toledo *et al.*, 1991; Toledo *et al.*, 1995; Hansberg, 1996). Además, al inicio de cada transición, los niveles de algunos antioxidantes aumentan, tal es el caso de enzimas como las catalasas y de los carotenos. Estos últimos también son oxidados en cada transición morfogénica y aumentan con cada estado diferenciado (Hansberg, 1996; Michán *et al.*, 2002).

Cuando los electrones del oxígeno en singulete y de los carbonilos excitados regresan a su nivel basal de energía emiten fotones y esta emisión se puede detectar con un fotomultiplicador. Se ha detectado quimioluminiscencia espontánea al inicio de cada paso morfogénico de la conidiación y se ha demostrado que esta quimioluminiscencia está asociada con un estado hiperoxidante. Al someter la célula a condiciones oxidantes la quimioluminiscencia se incrementa mientras que las condiciones hipóxicas y los agentes antioxidantes la suprimen. Asimismo, las condiciones oxidantes aceleran la diferenciación celular y las condiciones hipóxicas o los agentes antioxidantes la retardan o evitan. Con estas evidencias se puede sugerir que los cambios morfogénicos de la conidiación son precedidos por un estado hiperoxidante y que existe una relación causal entre ellos (Hansberg *et al.*, 1993; Hansberg, 1996). Con base en estas evidencias, se ha propuesto que la diferenciación celular ocurre en respuesta a un estado hiperoxidante, definiéndose éste como un estado en el que las especies de oxígeno reactivas sobrepasan a los mecanismos celulares antioxidantes. Así, el proceso de diferenciación celular se puede ver como un proceso de evasión del dióxígeno (Hansberg y Aguirre, 1990).

Las especies reactivas del oxígeno y la respuesta antioxidante

Los seres vivos están constantemente en contacto con el oxígeno y con las formas reactivas derivadas de él. El dióxígeno en su estado basal o de triplete (O_2) es la forma más estable del oxígeno. Tiene un potencial oxidante relativamente débil debido que su enlace oxígeno-oxígeno es muy fuerte y a que tiene un par de electrones no apareados con el mismo giro (números cuánticos *spin* paralelos, Fig. 4). Para que el O_2 acepte un par de electrones, éstos deben tener números cuánticos *spin* paralelos. Los electrones apareados de los orbitales atómicos o moleculares tienen números cuánticos *spin* antiparalelos, lo que restringe la aceptación de electrones del O_2 pues sólo puede tomar uno a la vez. (Green y Hill, 1984; Imlay, 2003). Existen formas del oxígeno cuya capacidad oxidante es considerablemente mayor, por ejemplo, al incrementar la energía del O_2 se debilita el enlace oxígeno-oxígeno y se provoca que los electrones tengan números cuánticos *spin* antiparalelos, de manera que se suprime la

restricción del *spin*. Estas formas excitadas y más reactivas del oxígeno son conocidas como oxígeno en singulete ($^1\text{O}_2$) (Fig. 4). Por otra parte, las especies reactivas como el superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot) se pueden generar por la reducción incompleta del O_2 en H_2O :



Al reducir parcialmente el O_2 también se debilita el enlace oxígeno-oxígeno y se elimina la restricción del *spin*, de manera que el O_2^- y el H_2O_2 son oxidantes univalentes más fuertes que el O_2 . Sin embargo, la estabilidad del H_2O_2 lo hace poco reactivo y la carga aniónica del O_2^- le impide reaccionar con moléculas ricas en electrones. En contraste, el OH^\cdot es la especie del oxígeno más reactiva conocida. Su reactividad oxidante parece estar limitada sólo por su nivel de difusión (Green y Hill, 1984; Halliwell y Gutteridge, 1999; Imlay, 2003).

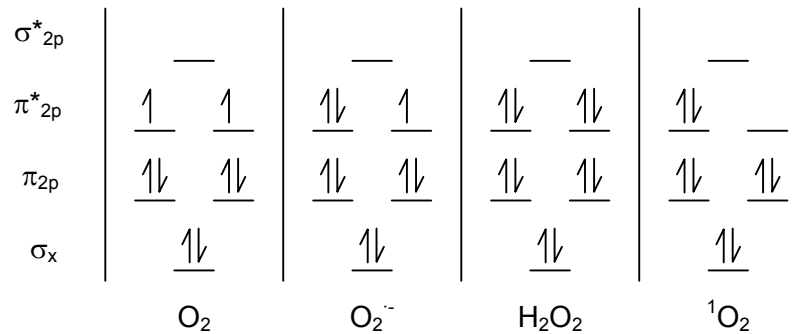


Figura 4. Diagrama de los orbitales moleculares del O_2 , el O_2^- , el H_2O_2 y el $^1\text{O}_2$.

Modificado de Halliwell y Gutteridge, 1999; Imlay, 2003. $\sigma_x = \sigma_{1s}, \sigma^*_{1s}, \sigma_{2s}, \sigma^*_{2s}, \sigma_{2p}$

Las especies del oxígeno reactivas se generan normalmente durante el metabolismo celular. En los organismos eucariontes, la mitocondria es considerada como la principal fuente de O_2^- de la célula. Durante la fosforilación oxidativa, algunos de los electrones que se transfieren en la cadena respiratoria salen de ella y pueden reducir al O_2 . Se ha calculado que alrededor del 2% del oxígeno consumido en la mitocondria genera O_2^- y se piensa que esto ocurre principalmente en los complejos I y III de la cadena respiratoria (Inoue *et al.*, 2003; Nohl *et al.*, 2005). La reducción por un electrón del O_2 en el complejo III (ubiquinona:citocromo *c* oxidorreductasa) ocurre durante la transferencia de electrones de la ubiquinona al citocromo *c* y se piensa que la semiubiquinona actúa como el principal reductor univalente. Asimismo, se ha

propuesto que la flavina del FMN del complejo I (NADH:ubiquinona oxidorreductasa) en su forma de semiquinona puede ser el donador de electrones del O_2 (Inoue *et al.*, 2003; Galkin y Brandt, 2005).

El O_2^- también se forma por enzimas como la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa. La dismutación de superóxido, a su vez, genera el H_2O_2 y puede ocurrir espontáneamente o por la acción de la superóxido dismutasa. El H_2O_2 también puede ser formado por enzimas como las oxidasas de alcoholes, de azúcares, de aminoácidos, del glicolato o del ácido úrico, así como por algunas de las enzimas que están implicadas en vías metabólicas como la β -oxidación de los ácidos grasos (Halliwell y Gutteridge, 1999; Babior, 2004). En las células eucariontes, muchas de estas enzimas están localizadas en el peroxisoma, que es considerado el principal sitio de formación de H_2O_2 intracelular. Asimismo, algunas de las enzimas responsables de eliminar esta especie del oxígeno reactiva tienen una localización peroxisomal (van den Bosch *et al.*, 1992; del Rio *et al.*, 2003).

El H_2O_2 es una de las especies del oxígeno menos reactivas; sin embargo, es capaz de inactivar algunas enzimas y de reaccionar con algunos intermediarios metabólicos como el piruvato o el 2-oxoglutarato. Además, a diferencia de otras especies del oxígeno reactivas, es capaz de atravesar libremente las membranas celulares. El principal efecto tóxico del H_2O_2 radica en que dentro de la célula es capaz de reaccionar con metales de transición como el Fe^{2+} o el Cu^+ y formar el radical hidroxilo (Fig. 5). Este radical es una de las especies químicas más reactivas y en las células reacciona rápidamente con cualquier molécula orgánica (azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, nucleótidos y ácidos orgánicos) generando daños como mutaciones en el ADN, la peroxidación de los lípidos de las membranas y la inactivación de muchas proteínas (Halliwell y Gutteridge, 1999; Imlay, 2003).

Uno de los principales mecanismos de defensa antioxidante de las células consiste en eliminar las especies del oxígeno reactivas como el superóxido y el peróxido de hidrógeno (Fig. 5).

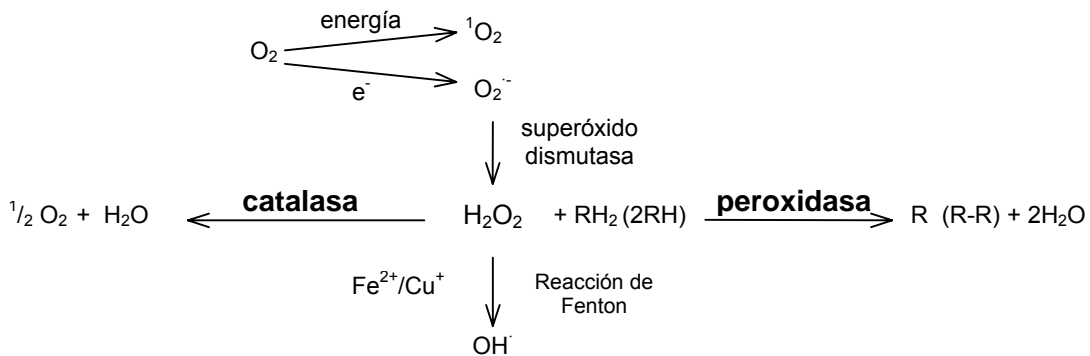


Figura 5. La formación y eliminación de algunas especies de oxígeno reactivas.

Las peroxidases son las enzimas responsables de reducir los peróxidos, entre ellos, el H₂O₂. Con base en el Comité de Nomenclatura de las enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB, por sus siglas en inglés, www.chem.qmul.ac.uk/iubmb) las peroxidases (EC 1.11.1) se clasifican de acuerdo con su especificidad (Tabla 1). Sin embargo, en términos más generales, se han agrupado tradicionalmente en catalasas y peroxidases. Las catalasas descomponen el H₂O₂ directamente en O₂ y agua (1):



mientras que las peroxidases utilizan otro sustrato como agente reductor (2) y pueden reducir a peróxidos distintos del H₂O₂ (3):

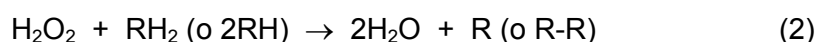


Tabla 1. Nomenclatura de las peroxidases de acuerdo con el NC-IUBMB

EC 1.11.1.1	NADH peroxidasa	EC 1.11.1.8	ioduro peroxidasa
EC 1.11.1.2	NADPH peroxidasa	EC 1.11.1.9	glutación peroxidasa
EC 1.11.1.3	peroxidasa de ácidos grasos	EC 1.11.1.10	cloruro peroxidasa
EC 1.11.1.4	peroxidasa de triptofano (ahora dioxigenasa de triptofano, EC 1.13.11.11)	EC 1.11.1.11	L-ascorbato peroxidasa
EC 1.11.1.5	citocromo c peroxidasa	EC 1.11.1.12	hidroperóxido de fosfolípido-glutación peroxidasa
EC 1.11.1.6	catalasa	EC 1.11.1.13	manganeso peroxidasa
EC 1.11.1.7	peroxidasa	EC 1.11.1.14	diarilpropano peroxidasa
		EC 1.11.1.15	peroxirredoxina

Las catalasas

Las catalasas llevan a cabo la dismutación del H₂O₂ a oxígeno y agua. La mayoría de estas enzimas están formadas por 4 subunidades idénticas con una masa de 200 a 260 kDa (≈480 aminoácidos por subunidad). Cada una de las subunidades tiene un grupo hemo. Existe una familia de catalasas tetraméricas denominadas de “subunidad-grande” que tienen una mayor masa, de 320-380 kDa (≈700 aminoácidos por subunidad) (Goldberg y Hochman, 1989; Klotz *et al.*, 1997; Zamocky y Koller, 1999).

Las catalasas monofuncionales están presentes en organismos de los tres dominios de los seres vivos (Archaea, Eubacteria y Eukaryota) y tienen un origen común. Los análisis filogenéticos han demostrado la existencia de tres grandes clados, dos de ellos, los clados 1 y

2, corresponden a las catalasas de subunidad pequeña y son ubicuas, mientras que las del clado 2, las catalasas de subunidad-grande, son exclusivas de las bacterias y los hongos (von Ossowski *et al.*, 1993; Klotz *et al.*, 1997; Klotz y Loewen, 2003).

Muchos microorganismos carecen de hemo-proteínas pues son incapaces de sintetizar el grupo hemo; sin embargo, algunos de ellos tienen enzimas con actividad de catalasa. Estas enzimas tienen átomos de manganeso en su centro catalítico y su estructura no tiene relación con la de las catalasas por lo que se les ha denominado pseudocatalasas. Se han descrito enzimas de este tipo en bacterias y arqueobacterias termófilas (Allgood y Perry, 1986; Amo *et al.*, 2002) y en lactobacilos (Kono y Fridovich, 1983; Igarashi *et al.*, 1996).

Las peroxidasas

Las peroxidasas son un grupo extenso y heterogéneo de enzimas que catalizan la reducción de los peróxidos. La mayoría de las peroxidasas son metaloenzimas que unen un grupo hemo; sin embargo, hay peroxidasas que usan átomos como vanadio o selenio y otras que usan residuos de aminoácidos como cisteínas en su mecanismo de acción.

Una de las familias de peroxidasas más importantes es la de las glutatión peroxidasas. Estas enzimas reducen el H_2O_2 , los peróxidos orgánicos (como los alquil-peróxidos, los hidroperóxidos de fosfolípidos u otros de lípidos complejos) o incluso a proteínas a partir del glutatión. El glutatión es un tripéptido con un grupo tiol (Glu-Cys-Gly) que participa en muchas de las reacciones redox de la célula. La transferencia de los electrones en el sitio catalítico ocurre a través de residuos de cisteínas o de seleno-cisteínas (en los animales) (Galiazzo *et al.*, 1987; Ursini *et al.*, 1995; Brigelius-Flohe, 1999; Flohe *et al.*, 1999; Sies, 1999).

Otra familia importante de peroxidasas es la de las peroxirredoxinas. Estas enzimas, también llamadas tiorredoxina peroxidasas (o tiol peroxidasas), son también peroxidasas cuya función depende de uno o dos grupos tioles. Reducen el H_2O_2 (o peróxidos orgánicos) utilizando los electrones provenientes del NADPH a través de la tiorredoxina y de la tiorredoxina reductasa. Ambas, las glutatión peroxidasas y las peroxirredoxinas se han encontrado en organismos de todos los reinos (o dominios) de los seres vivos (Carmel-Harel y Storz, 2000; Hofmann *et al.*, 2002).

Existen también las haloperoxidasas que son peroxidasas que tienen la propiedad de oxidar átomos de halógenos como el cloro, el bromo o el yodo. Esta reacción depende de hidroperóxidos, tales como el H_2O_2 , y resulta en la halogenación de diversos compuestos orgánicos. Se ha encontrado haloperoxidasas en las bacterias, los hongos, las algas y los animales. Estas enzimas no están relacionadas entre sí, pueden tener un grupo hemo, vanadio

en forma de vanadato (HVO_4^{2-}) o no tener metales en su centro catalítico (Krenn *et al.*, 1989; Littlechild, 1999).

Por otra parte, existe un gran número de peroxidasas que unen hemo en su sitio activo. Estas pueden ser divididas en dos grandes superfamilias, la de las peroxidasas de los animales y la de las peroxidasas de las plantas y los microorganismos (Welinder, 1985; O'Brien, 2000). En general, las peroxidasas de los animales son enzimas de 576-738 aminoácidos, unen el grupo hemo covalentemente y son poco específicas. Algunas tienen actividad de haloperoxidasas. Se incluyen en este grupo enzimas como la peroxidasa de la tiroides, la lactoperoxidasa, la mieloperoxidasa, la peroxidasa de los eosinófilos y la peroxidasa salival. Se han encontrado genes de estas peroxidasas en animales vertebrados e invertebrados (Taurog, 1999; O'Brien, 2000). Por su parte, las peroxidasas de las plantas difieren en gran medida de las de los animales y se piensa que representan familias de genes diferentes. Éstas tienen alrededor de 300 aminoácidos y no unen covalentemente al grupo hemo. Estas peroxidasas se encuentran en las plantas, en los hongos y en los procariontes. Se piensa que las peroxidasas de esta superfamilia tienen un origen común. Algunas de estas enzimas son muy específicas mientras que otras son multifuncionales. Se encuentran en esta familia las peroxidasas de las plantas, como la peroxidasa de raíz fuerte (rábano blanco) (clase III); las peroxidasas de secreción de los hongos, como la lignina peroxidasa y las manganeso peroxidasas (clase II); así como las peroxidasas intracelulares de las plantas, los hongos y las bacterias, como la citocromo *c* peroxidasa, la ascorbato peroxidasa y la catalasa-peroxidasa (clase I) (Welinder, 1985; Welinder *et al.*, 1992; Duroux y Welinder, 2003).

Las catalasa-peroxidasas

Las catalasa-peroxidasas, como su nombre lo indica, son las enzimas capaces de llevar a cabo eficientemente tanto la reacción de catalasa como la de peroxidasa. De acuerdo con la nomenclatura del NC-IUBMB, las catalasa-peroxidasas forman parte del grupo de las catalasas (EC1.11.1.6); sin embargo, el análisis de la secuencia de aminoácidos de las catalasa-peroxidasas demostró que no están relacionadas con las catalasas. Por el contrario, con base en su similitud con las peroxidasas de las plantas y los microorganismos, se han incluido en este grupo siendo, presumiblemente, homólogas (Welinder, 1991).

Las catalasa-peroxidasas se definieron en un principio por su dualidad funcional y por sus propiedades cinéticas. Mientras que las catalasas muestran una meseta de actividad entre valores de pH de 5.0 a 11.0, la actividad de las catalasa-peroxidasas tiene un óptimo que ocurre en un intervalo de pH de 6.0 a 6.5 (el óptimo de la actividad de peroxidasa suele ser más ácido,

de pH 5.0 - 5.5). Asimismo, a diferencia de las catalasas monofuncionales, las catalasa-peroxidasas son resistentes al inhibidor 3-amino-1,2,4-triazol, se inactivan con etanol-cloroformo y su actividad es sensible a la temperatura y a altas concentraciones de H₂O₂ (Hochman y Goldberg, 1991; von Ossowski *et al.*, 1993).

Las catalasa-peroxidasas contienen cerca de 730 aminoácidos y las hemo-peroxidasas de las plantas y los hongos alrededor de 320 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de las catalasa-peroxidasas reveló que sus genes están compuestos por dos segmentos que son semejantes entre sí y que cada uno de ellos lo es a la citocromo c peroxidasa. También se demostró que la estructura de cada extremo de las catalasa-peroxidasas se puede modelar con base en la estructura de la citocromo c peroxidasa, de manera que se ha sugerido que las catalasa-peroxidasas se originaron por la duplicación (y posterior fusión) de un gen de una peroxidasa ancestral. Con base en este modelo de la estructura de las catalasa-peroxidasas se observó que los aminoácidos esenciales para la catálisis y la secuencia consenso de unión del grupo hemo de las peroxidasas de las plantas están conservados sólo en el extremo N-terminal, lo que sugirió que sólo este extremo es catalítico (Welinder, 1991).

Las catalasa-peroxidasas han sido encontradas en organismos de los tres dominios de los seres vivos, Archaea, Bacteria y Eukaryota. La mayoría de ellas se encuentra en las eubacterias; sólo se han encontrado en 4 géneros de arqueobacterias y en los eucariontes sólo han sido descritas en los hongos.

Propiedades catalíticas

La eficiencia catalítica de la actividad de catalasa de las catalasa-peroxidasas es, en términos generales, un orden de magnitud menor que la de las catalasas monofuncionales; sin embargo, son considerablemente más eficientes que las peroxidasas de su misma familia. Por ejemplo, la eficiencia de catalasa de la peroxidasa de raíz fuerte (clase III) es tres ordenes de magnitud menor que la de las catalasa-peroxidasas, mientras que las ascorbato peroxidasas (clase I) no tienen actividad de catalasa (Zamocky y Koller, 1999; Hiner *et al.*, 2000; Hernández-Ruíz *et al.*, 2001).

Por otra parte, las catalasa-peroxidasas llevan a cabo la reacción de peroxidasa con una eficiencia alta, que es equiparable con la de las peroxidasas de su misma familia. Esto las distingue claramente de las catalasas que, si bien, también pueden realizar algunas reacciones de peroxidación, su eficiencia es baja y sólo pueden utilizar moléculas pequeñas (Havir y McHale, 1990; Nagy *et al.*, 1997).

Características estructurales de las catalasa-peroxidasas

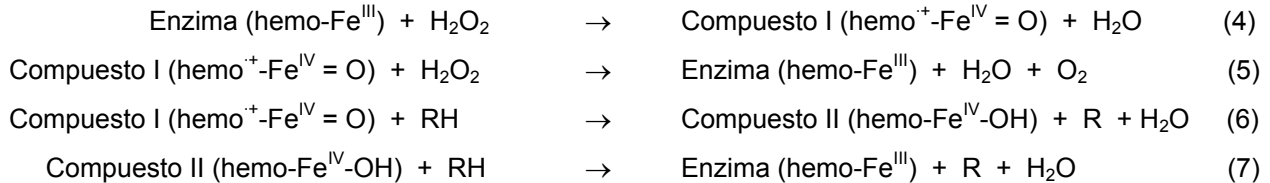
Las mayoría de las catalasa-peroxidasas son dímeros con subunidades idénticas que van de 60 a 85 kDa; sin embargo, también existen enzimas tetraméricas y monoméricas (Cendrin *et al.*, 1994; Zamocky y Koller, 1999; Paris *et al.*, 2003). Se han descrito catalasa-peroxidasas cuyas subunidades generan dímeros y tetrámeros interconvertibles y también enzimas cuyas subunidades se procesan durante el desarrollo y cambian su estado oligomérico de dímero a tetrámero irreversiblemente (Billman-Jacobe *et al.*, 1996; Zou y Schrempf, 2000).

El grupo prostético de las catalasa-peroxidasas suele ser el protohemo IX. Los valores de R_z (A_{406}/A_{280}) son cercanos a 0.5, lo que se ha interpretado como una asociación de un grupo hemo por dímero (Claiborne y Fridovich, 1979; Welinder, 1991; Marcinkeviciene *et al.*, 1995; Youn *et al.*, 1995; Obinger *et al.*, 1997; Zamocky y Koller, 1999). Sin embargo, los análisis de espectrometría de masas han revelado que la catalasa-peroxidasa (HPI) de *Escherichia coli* es una mezcla de enzimas que contienen 2, 3 ó 4 hemos por tetrámero (Hillar *et al.*, 2000). Estos resultados sugieren que la forma nativa de la enzima es capaz de unir un grupo hemo por monómero, mas que *in vitro* es susceptible de perderlo con facilidad. Con la estructura cristalográfica de las catalasa-peroxidasas de bacterias y arqueobacterias se demostró que cada subunidad de la enzima une un grupo hemo. Además, se han comprobado las predicciones hechas con anterioridad de que sólo el extremo N-terminal es capaz de unir al hemo (Yamada *et al.*, 2002; Carpena *et al.*, 2003; Bertrand *et al.*, 2004).

El domino catalítico y el mecanismo de la reacción catalítica

La primera reacción en el mecanismo catalítico de las catalasas y las peroxidasas es la misma: la heterólisis del enlace oxígeno-oxígeno del H_2O_2 (reacción 4). Como resultado de esta reacción se libera una molécula de agua y un átomo de oxígeno queda unido al Fe del grupo hemo. En esta reacción se transfieren dos electrones de la enzima a un oxígeno para formar agua. Uno de ellos proviene del Fe ($Fe\ III \rightarrow Fe\ IV$) y el segundo, en la citocromo c peroxidasa (y probablemente en algunas peroxidasas de animales) proviene de un tripofano (Trp191), mientras que en las demás hemo-peroxidasas, catalasas y en las catalasa-peroxidasas, proviene de la porfirina. A esta forma de la enzima se le denomina compuesto I y está formada por un ferroxilo y un radical catiónico ya sea porfirínico, de un aminoácido o una mezcla de ambos. El compuesto I puede ser reducido por otra molécula de H_2O_2 transfiriendo dos electrones simultáneamente (reacción de catalasa, 5) o bien, ser reducido por un compuesto que transfiera un solo electrón en dos reacciones secuenciales (reacción de peroxidasa, 6 y 7). Entre estas dos reacciones se forma un intermediario parcialmente reducido llamado compuesto

II (reacción 6). Las catalasa-peroxidasas son capaces de reducir eficientemente el compuesto I con el H₂O₂ (reacción 5) o con otros agentes reductores univalentes (reacciones 6 y 7) (Smith y Veitch, 1998; Regelsberger *et al.*, 1999; Jones, 2001; Ghibaudi y Laurenti, 2003).



La heterólisis del enlace oxígeno-oxígeno del H₂O₂ se favorece con su desprotonación previa; en las peroxidasas de las plantas y los microorganismos, esta reacción y la subsecuente protonación del OH⁻ son llevadas a cabo con una histidina (His123 en *Synechocystis*) del extremo distal de la cavidad del hemo que actúa como un catalizador ácido/base. Asimismo, hay una arginina distal (Arg 119 en *Synechocystis*) que coordina la catálisis del enlace oxígeno-oxígeno, probablemente estabilizando los intermediarios cargados (como el OH⁻ y el ulterior compuesto I). La mutación de estos dos aminoácidos en las catalasa-peroxidasas resulta en una escasa formación del compuesto I y en una pérdida de la actividades de catalasa y de peroxidasa (Vitello *et al.*, 1993; Howes *et al.*, 1997; Hillar *et al.*, 2000; Regelsberger *et al.*, 2000).

Por otra parte, hay un triptofano y un aspartato en el extremo distal de la cavidad del hemo que también son importantes para la catálisis de las catalasa-peroxidasas (Trp122 y Asp152 en *Synechocystis*). El triptofano distal está conservado en las peroxidasas de la clase I de las plantas pero en las demás enzimas de la familia es una fenilalanina. El aspartato, por su parte, sólo está conservado en las catalasa-peroxidasas (la posición equivalente es una serina en la citocromo c peroxidasa y una prolina en la ascorbato peroxidasa). La sustitución del triptofano distal en la citocromo c peroxidasa (W51A ó W52F) aumenta su actividad, mientras que la del residuo equivalente de la peroxidasa de raíz fuerte (F41A, F41V o F41W) la disminuye o anula (Roe y Goodin, 1993; Heering *et al.*, 2002). Al substituir este triptofano en las catalasa-peroxidasas, la formación del compuesto I no se ve afectada; sin embargo, la actividad de catalasa prácticamente se pierde mientras que la de peroxidasa se mantiene o incluso se incrementa. Lo mismo ocurre al reemplazar el aspartato distal, lo que indica que el anillo inólico del triptofano y el carboxilato del aspartato son dispensables para la formación del compuesto I y para su reducción con agentes reductores univalentes, pero son indispensables para su reducción con el H₂O₂ (Hillar *et al.*, 2000; Regelsberger *et al.*, 2000; Regelsberger *et al.*, 2001; Jakopitsch *et al.*, 2003b).

Se ha demostrado que el triptofano distal forma un enlace covalente con una tirosina vecina que a su vez está unida con una metionina adyacente. Este enlace fija las dos asas superficiales que limitan el acceso al sitio activo. Si se reemplaza la tirosina, al igual que con el triptofano distal, la enzima pierde su actividad de catalasa mas no la de peroxidasa. Estas evidencias sugieren que el enlace covalente se requiere para que la enzima tenga actividad de catalasa, o bien, para orientar correctamente al triptofano distal (Yamada *et al.*, 2002; Carpena *et al.*, 2003; Jakopitsch *et al.*, 2003a).

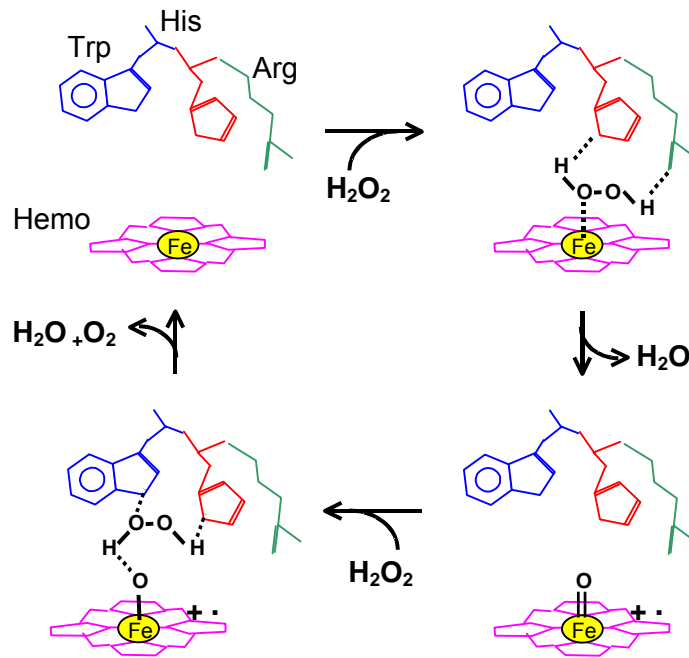


Figura 6. Mecanismo catalítico propuesto para la actividad de catalasa de las catalasa-peroxidases (Esquema modificado de Hillar, *et al.*, 2000).

Por otra parte, en el extremo proximal de la cavidad del sitio activo se encuentran residuos catalíticos o de coordinación del hemo que también son importantes. El quinto ligando del hierro del grupo hemo de las catalasa-peroxidases es una histidina. Este residuo está coordinado por un aspartato que a su vez está en estrecha relación con un triptofano. Estos residuos están conservados en la familia de las peroxidases de las plantas y los microorganismos y son esenciales para la actividad de las enzimas. Es interesante observar que con la sustitución del triptofano proximal (W341F en *Synechocystis*) nuevamente se genera una enzima sin actividad de catalasa pero con actividad de peroxidasa, lo que sugiere que la dualidad funcional de las catalasa-peroxidases es compleja (Jakopitsch *et al.*, 2002).

ANTECEDENTES

Pensamos que la diferenciación celular ocurre en respuesta a un estado hiperoxidante. Se ha demostrado la presencia de un estado hiperoxidante al inicio de cada transición morfogénica del desarrollo asexual de *N. crassa*; sin embargo, no se ha demostrado concluyentemente una relación causal entre los estados hiperoxidantes y la diferenciación celular. Estamos interesados en estudiar las enzimas responsables de generar y eliminar las especies reactivas del oxígeno para entender la relación que existe entre éstas y la diferenciación celular. Al manipular la expresión de estas enzimas, podemos alterar la generación de las especies del oxígeno reactivas y así evaluar la participación de estas moléculas en los procesos de diferenciación del hongo.

La respuesta antioxidante en los hongos

El sistema de defensa antioxidante de la mayoría de los hongos incluye una amplia gama de enzimas antioxidantes que desempeñan funciones específicas en diferentes estructuras subcelulares o en diferentes estadios del desarrollo. Así, las tres catalasas y la catalasa-peroxidasa de *Aspergillus nidulans* (anamorfo de *Emericella nidulans*) se expresan de manera transitoria en su ciclo de vida y desempeñan funciones diversas. La catalasa A (CatA) es específica de los conidios y una parte importante se encuentra asociada con la pared celular (Navarro *et al.*, 1996; Navarro y Aguirre, 1998). La catalasa B (CatB) aparece después de la germinación y su expresión se mantiene constante hasta el final de la conidiación (Kawasaki *et al.*, 1997). La catalasa C (CatC) es una enzima constitutiva de los peroxisomas (Kawasaki y Aguirre, 2001) y la catalasa-peroxidasa se regula durante el ciclo sexual y está presente en las células *Hülle*, una serie de células globosas que probablemente actúan como células nodrizas de los cuerpos fructíferos (Scherer *et al.*, 2002).

Con base en su genoma (*Broad Institute*, www.broad.mit.edu), *N. crassa* cuenta con más de diez posibles enzimas con actividad antioxidante: tres peroxirredoxinas, una glutatión peroxidasa, una citocromo *c* peroxidasa, tres catalasas, tres superóxido dismutasas y una catalasa-peroxidasa además de otras posibles peroxidases. Desde hace tiempo se caracterizó en este hongo una actividad de catalasa que es inducible por nitrato, esta actividad, sin embargo, probablemente fue consecuencia de una mezcla de catalasas (Jacob y Orme-Johnson, 1979a, 1979b); después se encontró que había tres enzimas con actividad de catalasa, que se regulan de manera diferente durante el desarrollo y que son codificadas por tres genes distintos *cat-1*, *cat-2* y *cat-3* (Simmons *et al.*, 1987; Chary y Natvig, 1989). Una

cuarta catalasa (CAT-4), presumiblemente peroxisomal, se puede deducir a partir de la secuencia del genoma. La CAT-1 se observa prácticamente durante todo el ciclo de vida asexual y es la actividad predominante de los conidios. Estas esporas tienen alrededor de 60 veces más actividad de catalasa que el micelio en crecimiento exponencial y esta actividad se debe principalmente a la CAT-1 y, en menor medida, a la CAT-2. La CAT-3, por su parte, es la principal actividad de catalasa del hongo en crecimiento, particularmente durante el crecimiento exponencial. La CAT-1 y la CAT-3, se regulan por situaciones de tensión. La CAT-1 se induce por choque térmico y al crecer en etanol como fuente de carbono, mientras que la CAT-3 se induce además en las situaciones de tensión oxidativa generadas con H₂O₂, con metil-viológeno (paraquat) o durante el crecimiento en ácido úrico; así como al privar de carbono al hongo o al crecerlo en nitrato como fuente de nitrógeno (en relación al crecimiento en amonio) (Michán *et al.*, 2002). La CAT-2, además de estar relacionada con los conidios, también se induce por choque térmico (Chary y Natvig, 1989; Hansberg, 1996). La CAT-1, la CAT-3 y previsiblemente la CAT-4 son catalasas monofuncionales, la CAT-1 y la CAT-3 son catalasas grandes que exhiben una alta eficiencia catalítica y la CAT-1, además, tiene gran estabilidad en un intervalo amplio de pH, en altas temperaturas y ante agentes desnaturalizantes (Díaz *et al.*, 2001; Díaz *et al.*, 2005). Asimismo, la CAT-1 (Díaz *et al.*, 2004) y la CAT-3 (Díaz, Valdés, Rudiño-Piñera, Horjales y Hansberg, en preparación) se han cristalizado y se conoce su estructura tridimensional con detalle.

Las catalasa-peroxidasas en los hongos

Al inicio de este proyecto de investigación existían evidencias bioquímicas y moleculares de la presencia de las catalasa-peroxidasas en los hongos. Sin embargo, no se había clonado ningún gen completo, ni se tenía evidencia alguna de la correspondencia entre los genes y las proteínas codificadas por ellos. Se conocían enzimas con características semejantes a las de las catalasa-peroxidasas de las bacterias en los hongos *Septoria tritici* (Anamorfo de *Mycosphaerella graminicola*) (Levy *et al.*, 1992) y *Penicillium simplicissimum* (Fraaije *et al.*, 1996). Asimismo, varias secuencias parciales de ADNc con similitud con las catalasa-peroxidasas fueron clonadas de *M. graminicola* (www.ncbi.nlm.nih.gov) y *N. crassa* (Nelson *et al.*, 1997). De manera que, presumiblemente, había genes homólogos a los de las catalasa-peroxidasas de las bacterias en los hongos.

En un trabajo realizado para identificar genes que se expresan diferencialmente en *N. crassa*, se clonaron e identificaron 838 secuencias parciales de ADNc. Tres de estas secuencias (encontradas en la fase somática del hongo) mostraron similitud con las catalasa-

peroxidasas (Nelson *et al.*, 1997). Al rastrear una de estas secuencias (NM6H12, *GenBank* AA901970) mediante una hibridación de tipo *Northern*, se observó que la acumulación del transcrito coincidió con la inducción de la actividad de la CAT-2 en el micelio aéreo (Michán y Hansberg, observación no publicada). Por otra parte, algunos experimentos preliminares sugirieron que la CAT-2 de *N. crassa* era una enzima poco sensible a inhibidores específicos de las catalasa monofuncionales (Díaz y Hansberg, observación no publicada). Dadas estas relaciones, se estableció la hipótesis de que la CAT-2 de *N. crassa* era una catalasa-peroxidasa y se planteó este proyecto de investigación, cuyo objetivo primordial fue determinar la identidad, el papel y la regulación de la CAT-2 de *N. crassa*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterización genética y estructural de la catalasa-peroxidasa (CAT-2) de *Neurospora crassa*.

Objetivos particulares

- 1) Caracterizar la CAT-2.
- 2) Determinar la identidad y la estructura del gen *cat-2*.
- 3) Determinar la localización intracelular de la enzima.
- 4) Estudiar la regulación de la CAT-2.
- 5) Cancelar el gen *cat-2* y evaluar la fisiología de la cepa mutante *cat-2*⁻.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas, plásmidos y condiciones de cultivo

Todas las cepas empleadas en este trabajo provinieron de la colección del centro de genética de hongos “*Fungal Genetics Stock Center*” (FGSC) (McCluskey, 2003). Las cepas utilizadas fueron del linaje St. Lawrence (Oak Ridge, Cal, EUA). Las cepas silvestres fueron la 74-OR23-1A y la 74-OR8-1a (FGSC 987 y 988, respectivamente) y se emplearon las cepas mutantes *his-3* (6103), $\Delta mat A::ADE5^{sc}$; *ad-2*; *lys-1*; *thi-4* (8292), *mat a^{m30}* (7450), *acon-2* (3262), *acon-3* (3286), *fl* (7430) y *bd* (1858). Las clonaciones para las reacciones de secuenciación se realizaron en los vectores *TOPO-TA* (Invitrogen, Carlsbad, EUA). El plásmido pDE1 fue usado para dirigir las integraciones ectópicas al locus *his-3* y fue donado amablemente por D. Ebole (Texas A&M University, EUA) (Ebole, 1990). El hongo se creció en medio mínimo de Vogel (MV) y las cruas sexuales se realizaron en medio sintético para cruas (SC) ambos con 1.5% de sacarosa como fuente de carbono. Cuando se utilizaron otras fuentes de carbono en lugar de la sacarosa se emplearon en las siguientes concentraciones: acetato (de potasio) 40 mM, ácido oléico 6 mM, ácido úrico 5-10 mM, glicerol al 2% y etanol o metanol al 4%. Para inducir la formación de colonias aisladas se empleó medio con sorbosa (MS) (fructosa al 0.05%, glucosa al 0.05% y 2% de sorbosa en medio MV) (Davis y de Serres, 1970). Para regenerar los protoplastos y las células sometidas a electroporación se empleó medio MS con sorbitol 1 M como estabilizador osmótico. Los medios de cultivo sólidos se hicieron con agar al 2%. Los cultivos líquidos se realizaron a partir de 10^6 conidios/ml con una relación aire/líquido de 3:2 y se incubaron con una agitación orbital de 200 rpm. Para obtener los conidios se inocularon matraces de 500 ml con 100 ml de medio MV/sacarosa-agar con 10^6 conidios y se incubaron 3 días en la obscuridad a 30°C y 2 días con iluminación a 25°C. Para el crecimiento de las cepas auxótrofas, los medios de cultivo fueron complementados con L-histidina, L-lisina, adenina (200 µg/ml) o tiamina (10 µg/ml).

Análisis del desarrollo sexual y asexual

El proceso de conidiación se indujo al exponer al aire un micelio en crecimiento exponencial (16 h en medio MV/sacarosa). Se filtraron 100 ml del cultivo en papel filtro (Whatman, Middlesex, Inglaterra) y el micelio se expuso al aire. Se separaron las estructuras diferenciadas e inmediatamente se congelaron a -80°C hasta su análisis. El micelio control consistió en micelio filtrado pero no expuesto al aire. Para ello, el micelio se cubrió con un segundo papel filtro y

sobre éste se colocó una segunda capa de micelio. La masa del micelio aéreo se determinó por peso seco y el número de conidios se contó en una cámara de Neubauer.

El proceso de formación de conidios en cultivos líquidos se analizó en medio MV/sacarosa. Para ello, muestras de diferentes tiempos de los cultivos se examinaron con un microscopio de luz y se determinó el número de los conidios libres en el medio.

El desarrollo sexual se estudió en cajas de cultivo con medio SC. Las colonias de la cepa receptora se obtuvieron a partir de 1000 conidios y se fertilizaron después de 6 días de crecimiento a 25°C con una suspensión conidios de una cepa del sexo opuesto. La intensidad luminosa se determinó con un exposímetro (Extech Instruments, Waltham, EUA) y se mantuvo en 80 lx. Se colectaron muestras de las diferentes estructuras del desarrollo y se congelaron a -80°C hasta su análisis. Para determinar el número de los cuerpos fructíferos, las colonias de 6 días se fertilizaron con un mismo volumen (10 µl) de la suspensión de conidios (5 x 10⁶ conidios/ml) y las estructuras sexuales se contaron bajo un microscopio estereoscópico.

Tratamientos de estrés oxidativo, osmótico y por calor

Para someter al hongo a un choque térmico, se filtró el micelio de la etapa exponencial del crecimiento y se transfirió inmediatamente a un matraz con medio MV/sacarosa precalentado a 45°C. El cultivo se mantuvo a esa temperatura durante 3 horas y se colectaron muestras a lo largo del experimento. Para investigar la viabilidad de diferentes cepas ante el choque térmico, 1 ml de un cultivo de 6 horas o de conidios intactos se transfirió de 30°C a un baño de agua a 42°C ó 48°C por 30 ó 60 minutos. Para determinar la viabilidad ante los hidroperóxidos las células fueron incubadas durante 30 minutos a 30°C con diferentes concentraciones de H₂O₂ (1 - 50 mM) o *tert*-butil hidroperóxido (0.5 - 10 mM). Después de hacer las diluciones adecuadas, las células fueron sembradas en placas con medio MS y después de 3 días a 30°C se determinó el número de colonias. Los experimentos control consistieron en muestras de 1 ml que se mantuvieron a 30°C.

Para valorar el efecto de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno se comparó el crecimiento en cajas con medio MV/sacarosa con NaNO₂ (5 - 10 mM) a pH 5.0, 5.5 y 7.0 en donde se pueden formar especies como el NO·, NO₂·, NO₃, N₂O₃, N₂O₄ y el ONOO⁻ (ONOOH) (Ehrt *et al.*, 1997; Halliwell y Gutteridge, 1999). Por otra parte, para conocer el efecto del estrés osmótico, se evaluó el crecimiento del hongo en cajas con medio MV/sacarosa con altas concentraciones (1.0 - 1.2 M) de sorbitol o NaCl.

Obtención de las proteínas y de los ácidos nucleicos

La células se rompieron en un mortero con nitrógeno líquido e inmediatamente después se obtuvo el ARN total y las proteínas solubles. El ARN se purificó con *TRIzol* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del proveedor. El amortiguador de extracción de las proteínas consistió en HEPES 20 mM con 1 mM de fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF), 1 mM de ditioneitol (DTT) y 0.1 mM de desferroxamina (Desferral). La cuantificación de las proteínas se hizo por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). El método de purificación del ADN fue adaptado a partir de un protocolo de *Aspegillus* (Timberlake, 1980) en el que el micelio de *N. crassa* se obtuvo después de crecer 10^6 conidios en 30 ml de medio MV/sacarosa por 36 horas sin agitación.

Electroforesis de proteínas y zimogramas de actividad de catalasa y peroxidasa

El análisis electroforético de las proteínas se llevó a cabo en geles de poliacrilamida siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Para observar las proteínas en su estado nativo se excluyó la desnaturalización de las muestras con ebullición, así como el uso del dodecil sulfato (SDS) y del β -mercaptoetanol. Para el análisis electroforético de doble dimensión, la primera dimensión consistió en un isoelectroenfoque en capilares realizado en geles de acrilamida al 5.5% con una mezcla de los siguientes anfolitos: pH 3.5 - 10.0 (0.75%), pH 4.0 - 6.5 (5%), pH 5.0 - 7.0 (1.7%) y pH 2.5 - 5.0 (0.8%). Las muestras se cargaron con los anfolitos de pH 3.5 - 10.0 (1%) y pH 4.0 - 6.5 (5%) y la electroforesis se corrió en H_3PO_4 12 μ M (ánodo) y NaOH 20 mM (cátodo) (Michán *et al.*, 2002). La segunda dimensión consistió en una electroforesis en condiciones no desnaturalizantes como la descrita con anterioridad.

Para evidenciar la actividad de catalasa en el gel, éste se incubó por 3 min en metanol al 5%, se lavó dos veces con agua y luego se incubó durante 5 min con H_2O_2 10 mM. Posteriormente, el gel se enjuagó con agua y la actividad de catalasa fue revelada con una mezcla 1/1 de ferricianuro de potasio (2%) y cloruro férrico (2%) preparada en el momento. La reacción se detuvo con ácido acético al 10% (Lledías *et al.*, 1998). Por su parte, la actividad de peroxidasa se reveló con una mezcla de *o*-dianisidina (0.5 mM) / H_2O_2 (0.1 mM) en amortiguador de acetatos 50 mM a pH 6.0 (Obinger *et al.*, 1997).

Purificación de la CAT-2

El micelio del hongo se creció durante 6 días en medio MV-agar con sacarosa (0.4%) y metanol (4%) y se homogenizó utilizando perlas de vidrio y el amortiguador de extracción. El extracto se precipitó con dos volúmenes de acetona y la fracción soluble se fraccionó con $(NH_4)_2SO_4$ al 20%

y luego al 35%. La CAT-2 precipitada en la última fracción fue resuspendida en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 6.8 con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 M y transvasada a una columna de fenil-sefariosa (CL-4B, Amersham, Uppsala, Suecia) previamente equilibrada con el mismo amortiguador. La columna se lavó con concentraciones decrecientes del amortiguador y la CAT-2 se desprendió de la columna con H_2O . Finalmente, la enzima se separó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes y se extrajo del mismo.

Obtención del hemo y análisis por HPLC

Se obtuvo el hemo de la CAT-2 purificada con acetona ácida en la oscuridad. La acetona se evaporó con una corriente de N_2 y el hemo se recuperó en acetonitrilo con 0.1% de ácido trifluoroacético. El hemo fue separado por HPLC en una columna *SUPELCOSIL LC-318* de 300 Å (Sigma) con un gradiente de agua-acetonitrilo entre 25% y 100% de acetonitrilo con 0.05% de ácido trifluoroacético (Lledías *et al.*, 1998). Se emplearon las porfirinas de 8 a 4 carboxilos, así como la deuteroporfirina-IX, la mesoporfirina-IX y la protoporfirina-IX (Frontier Scientific, Inc. Logan, EUA) como patrones de referencia.

Determinación de las actividades enzimáticas

La actividad de catalasa fue determinada por oximetría en una cámara sellada con un electrodo de tipo Clark. La reacción se llevó a cabo en 2 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 6.8 con una concentración conocida de H_2O_2 . Una unidad de actividad se definió como los μmoles de O_2 producidos por minuto en dichas condiciones (Lledías *et al.*, 1998).

El ensayo general para determinar las actividades de peroxidasa se llevó a cabo en amortiguador de acetatos 50 mM a pH 5.5 con H_2O_2 2 mM y 1 mM del agente reductor. La actividad se monitoreó por espectrofotometría a 460 nm para la *o*-dianisidina y la 3,3-diaminobencidina, a 436 nm para el guaiacol, a 290 nm para el ascorbato, a 405 nm para el ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y a 340 nm para el NADH y el NADPH (Putter y Becker, 1984; Marcinkeviciene *et al.*, 1995; Hiner *et al.*, 2000). La actividad de glutatión peroxidasa se determinó en un ensayo acoplado a la glutatión reductasa. La reacción se llevó a cabo en amortiguador de fosfatos 500 mM, pH 7.0 con EDTA 0.5 mM, glutatión 1 mM, NADPH 150 μM , H_2O_2 1.5 mM y 0.25 U de glutatión reductasa (de *Saccharomyces cerevisiae*). Se determinó la desaparición del NADPH dependiente del H_2O_2 y del dioxígeno mediante espectrofotometría a 340 nm (Flohe y Gunzler, 1984). Para determinar la actividad de citocromo *c* peroxidasa se siguió la oxidación del citocromo *c* a 550 nm en

amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.0 con citocromo *c* 40 μ M (reducido estequiométricamente con DTT) y H₂O₂ 180 μ M (Bonagura *et al.*, 1999). Para detectar la actividad de peroxidasa de manganeso se siguió la formación de Mn^{III} a 238 nm en amortiguador de tartrato de sodio y potasio 100 mM con MnSO₄ 0.1 mM y H₂O₂ 0.1 mM (Zou y Schrempf, 2000).

Para determinar la actividad de fumarasa (hidratasa de fumarato, EC 4.2.1.2) se siguió la aparición del fumarato a 240 nm a partir de L-malato 28 mM en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.5 (Mark, 1984). La actividad de uricasa (urato oxidasa, EC 1.7.3.3) se determinó a 293 nm con ácido úrico 40 μ M en amortiguador de boratos 20 mM, pH 8.5 y saturado de oxígeno; mientras que la actividad de la isocitrato liasa (EC 4.1.3.1) se monitoreó a 324 nm en amortiguador de fosfatos 65 mM, pH 7.4 con fenilhidracina 50 mM, MgCl₂ 50 mM, DTT 2 mM y DL-isocitrato 6.25 mM (Kionka y Kunau, 1985). Las actividades enzimáticas se determinaron en la región lineal de las curvas cinéticas y una unidad de actividad se definió como la desaparición de 1 μ mol de sustrato por minuto o el cambio de una unidad de densidad óptica por minuto.

Fraccionamiento celular y microscopía electrónica

Los experimentos se hicieron con micelio del hongo crecido durante 14 horas en medio MV/sacarosa y 24 (ó 20) horas en medio MV/acetato (o MV/oleato). El fraccionamiento celular se hizo a partir de protoplastos; para ello, la pared celular del micelio del hongo (12 mg/ml) fue digerida con 2 mg/ml de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) durante 3 horas en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.6 (con CaCl₂ 0.1 mM, MgCl₂ 1 mM, KCl 100 mM, sorbitol 0.45 M y 2% de sacarosa). Los protoplastos se filtraron a través de 8 capas de gasa y se lavaron 3 veces mediante centrifugación (420 x g). Después de resuspender y romper los protoplastos en el amortiguador del fraccionamiento (Tris-HCl 10 mM a pH 7.4, EDTA 1 mM, sacarosa 0.44 M, KCl 10 mM y MgCl₂ 5 mM), la suspensión se colocó sobre un gradiente de sacarosa (30 - 60% en Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 con EDTA 1 mM) y se centrifugó por 2 horas a 43,700 x g en un rotor de columpio. El gradiente se dividió en fracciones de 1 ml, se determinó su densidad con un refractómetro de mano (Atago, CO. Tokio, Japón) y la actividad de las enzimas que se utilizaron como marcadoras de las estructuras subcelulares (fumarasa, isocitratoliasa y uricasa).

Para la microscopía electrónica, el micelio se fijó con glutaraldehído (0.5%) y se trató después con tetraóxido de osmio (2%), ambos en amortiguador de cacodilatos (100 mM, pH 7.2). Las muestras se deshidrataron con etanol que se reemplazó luego por óxido de propileno y se embebieron en resina Epon-Araldite. Se hicieron cortes de 80-90 nm, se colocaron en

rejillas de níquel y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL1200EXII (Jeol Ltd., Tokio, Japón).

Análisis mediante hibridaciones de ácidos nucleicos

Las hibridaciones de tipo "Northern" y "Southern blot" se realizaron siguiendo los protocolos establecidos (Sambrook y Russell, 2001). Brevemente, se realizaron electroforesis en geles de agarosa (1%) con 15 µg de ARN total o con 20 µg de ADN genómico digerido con una endonucleasa de restricción adecuada. El ADN fue desnaturalizado con NaOH (0.5 M) y el ARN con formaldehído-formamida. Los ácidos nucleicos se transfirieron a membranas *Hybond-N* (Amersham) y se fijaron con luz ultravioleta. Las hibridaciones se llevaron a cabo con sondas específicas de los genes *cat-2* o *his-3* marcadas radioactivamente. La sonda *cat-2* consistió en un fragmento *EcoRI* de 2.4 kb del plásmido pCP1 mientras que la *his-3* fue un fragmento *SaII* de 1.5 kb del plásmido pDE1. Las sondas se marcaron con [α -³²P] dCTP utilizando el estuche *Random Primed DNA Labeling Kit* (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania).

Transformación de *N. crassa*

La transformación de *N. crassa* se llevó a cabo mediante la electroporación de conidios (Margolin *et al.*, 1997) o por la fusión de protoplastos con polietilenglicol (Aramayo y Metzberg, 1996) obteniendo los protoplastos con las enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich) en vez de la Novozyma 234.

Generación de las cepas mutantes *cat-2*^{RIP}

Para obtener las cepas mutantes sin la actividad de la CAT-2, se empleó el sistema de anulación de genes de *N. crassa* conocido como RIP (del inglés *Repeat-induced point mutation*) que ocurre durante la reproducción sexual y que consiste en la generación de mutaciones en las secuencias del ADN que se encuentran duplicadas (Selker, 1997). Para introducir una segunda copia del gen *cat-2* en el genoma del hongo, se generó el vector pCP2 que contiene una copia del gen *cat-2* adyacente a un fragmento del gen *his-3*, que permite complementar una cepa *his-3* con el alelo Y234M723 (cepa FGSC 6103). El plásmido pCP2 se generó al reemplazar el fragmento *EcoRI* (gen *lacZ*) del vector pDE1 con el fragmento *EcoRI* de 2.4 kb del plásmido pCP1 (ADNc del gen *cat-2* de 217 pb abajo del ATG inicial hasta la secuencia de poliadenilación). La cepa *his-3* (6103) fue transformada con el plásmido pCP2 circular y se recuperaron las cepas protótrofas de histidina. Las cepas en las que el gen *cat-2* se integró junto al locus *his-3* reparado se seleccionaron mediante una hibridación de tipo *Southern*. Este

análisis se realizó con el ADN genómico de las cepas transformantes digerido con *EcoRI*, *Sall* o *SspI* y se hibridó con las sondas de los genes *cat-2* e *his-3*. Después de hacer tres ciclos de resiembras a partir de colonias aisladas en el medio selectivo se obtuvo la cepa transformante en estado homocariote y ésta fue cruzada con una cepa silvestre. De la progenie de esta cruce se seleccionaron las cepas protótrofas de histidina que perdieron la actividad de la CAT-2 (cepas *cat-2*^{RIP}). Adicionalmente, se analizó la acumulación del transcrito *cat-2* y, para verificar el proceso de RIP, se clonó y secuenció el gen *cat-2* de algunas de estas cepas.

Complementación de la cepa mutante *cat-2*^{RIP}.

La misma estrategia de integración dirigida al locus *his-3* descrita en la sección anterior fue empleada para complementar las cepas *cat-2*^{RIP} con el gen *cat-2*. La complementación con el gen silvestre se llevó a cabo usando el plásmido pCP5. Éste se obtuvo del vector pDE1 en el cual el fragmento *EcoRI* se reemplazó con el gen *cat-2* silvestre. El gen *cat-2* fue amplificado mediante PCR. El gen comprende desde 900 pb arriba hasta 2650 pb abajo del ATG inicial.

Análisis de las secuencias, estructurales y filogenéticos.

Todas las secuencias de los genes (y proteínas) empleadas en este trabajo fueron obtenidas de las bases públicas de datos. Los números de acceso y las bases de datos se indican en la Tabla 5 (Apéndice 1). Los análisis de las secuencias del ADN y de las proteínas se hicieron con el programa *BioEdit* 5.0.9 (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit) (Hall, 1999). Los alineamientos fueron hechos mediante el algoritmo *clustalW* empleando los parámetros originales (Thompson *et al.*, 1994) y se revisaron visualmente. Los análisis filogenéticos se hicieron con los algoritmos incluidos en los programas *PAUP* 3.1 y 4.0 (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) (www.paup.csit.fsu.edu) (Swofford, 1991, 2003) y *PHYLP* (*PHYLogeny Inference Package*) (Felsenstein, 1989).

El modelo estructural tridimensional de la CAT-2 se hizo en el servidor SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) (Guex y Peitsch, 1997; Schwede *et al.*, 2003) con base en la identidad de la CAT-2 con proteínas homólogas cuya estructura tridimensional se conoce. El modelo fue optimizado con la estructura de la enzima de *Burkholderia pseudomallei* (Carpena *et al.*, 2003). El modelo para el dímero de la CAT-2 y la adición de los grupos hemo se realizó con el programa *O* (Jones *et al.*, 1991) basándonos en las coordenadas del dímero de *B. pseudomallei*. Las imágenes se hicieron con el programa *Ribbons* (Carson, 1997).

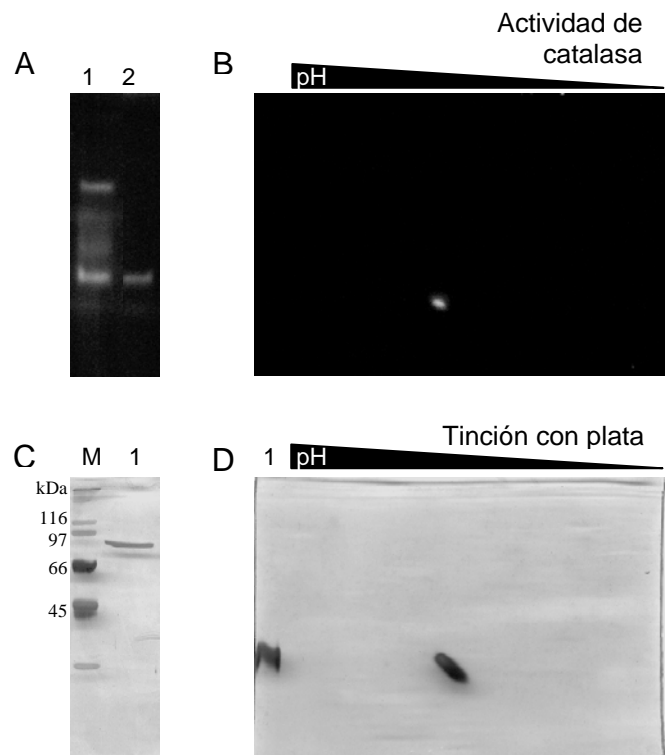
RESULTADOS

LA PROTEÍNA

La purificación de la CAT-2 de *Neurospora crassa*

Para determinar la identidad de la CAT-2 de *N. crassa* se diseñó un protocolo para purificar la enzima. Debido a que la enzima se induce cuando el hongo crece en alcoholes (ver más adelante la sección de la regulación de la CAT-2), la CAT-2 se purificó de micelio crecido en presencia de metanol. El micelio se desintegró en amortiguador de extracción y el extracto soluble se precipitó con acetona. Esta fracción se resuspendió en amortiguador de extracción y se fraccionó con sulfato de amonio. Se realizaron diferentes ensayos para purificar la CAT-2 por medio de varios tipos de cromatografía en columna: de intercambio aniónico (DEAE), de exclusión molecular (Sefadex), de interacción hidrofóbica (Fenil-sefarosa), de afinidad por sustrato utilizando glutatión y de inmunofinidad con anticuerpos Anti-CAT-2, generados en el laboratorio (Montes de Oca, 1999). Los mejores resultados se obtuvieron con la cromatografía de interacción hidrofóbica; sin embargo, para conseguir la proteína pura, fue necesario obtenerla de geles de electroforesis (Fig. 7 A). Con este protocolo fue posible obtener la CAT-2 pura a homogeneidad (Fig. 7 D).

Figura 7. Purificación de la CAT-2 de *N. crassa*. Electroforesis en gel en condiciones no desnaturizantes en una (A) y en dos dimensiones (B). Se muestra la fracción obtenida de la cromatografía de fenil-sefarosa (A, carril 1) y la CAT-2 pura obtenida del gel después de la electroforesis (A, carril 2 y B). Los geles en (A y B) se revelaron por actividad de catalasa. La fracción de la CAT-2 pura se separó mediante SDS-PAGE (C, carril 1) y con una electroforesis en gel no desnaturizante (D) en una (carril 1) y en dos dimensiones. Los geles en (C y D) se tiñeron con plata.



El grupo prostético de la CAT-2

El espectro de absorción de la CAT-2 pura mostró un patrón con valores máximos de absorción a los 280 nm y 403 nm. Este último pico corresponde a la banda de Soret que presentan las proteínas que unen grupos hemo. La relación de absorbencia A_{403}/A_{280} de este espectro fue de 0.46 y coincidió con la de las catalasa-peroxidadas que suele ser cercana a 0.5 (Fig. 8 A). El grupo hemo de la CAT-2 fue obtenido con acetona ácida y se analizó mediante HPLC. El tiempo de retención en una columna de interacción hidrofóbica sugirió que la mayor parte del hemo de la CAT-2 es una porfirina dicarboxílica que es más hidrofílica que la protoporfirina-IX. El espectro de absorción del pico mayor del hemo purificado fue diferente del espectro de la protoporfirina-IX (Fig. 8 B) y fue semejante al de la deuteroporfirina-IX (no mostrado). Sin embargo, un pequeña fracción del hemo de la CAT-2 comigra con la protoporfirina-IX y otros dos picos menores migran entre la mesoporfirina-IX y la deuteroporfirina-IX (Fig. 8 C). De manera que el grupo hemo de la CAT-2 puede estar formado por una mezcla de hemos que incluye al protohemo-IX.

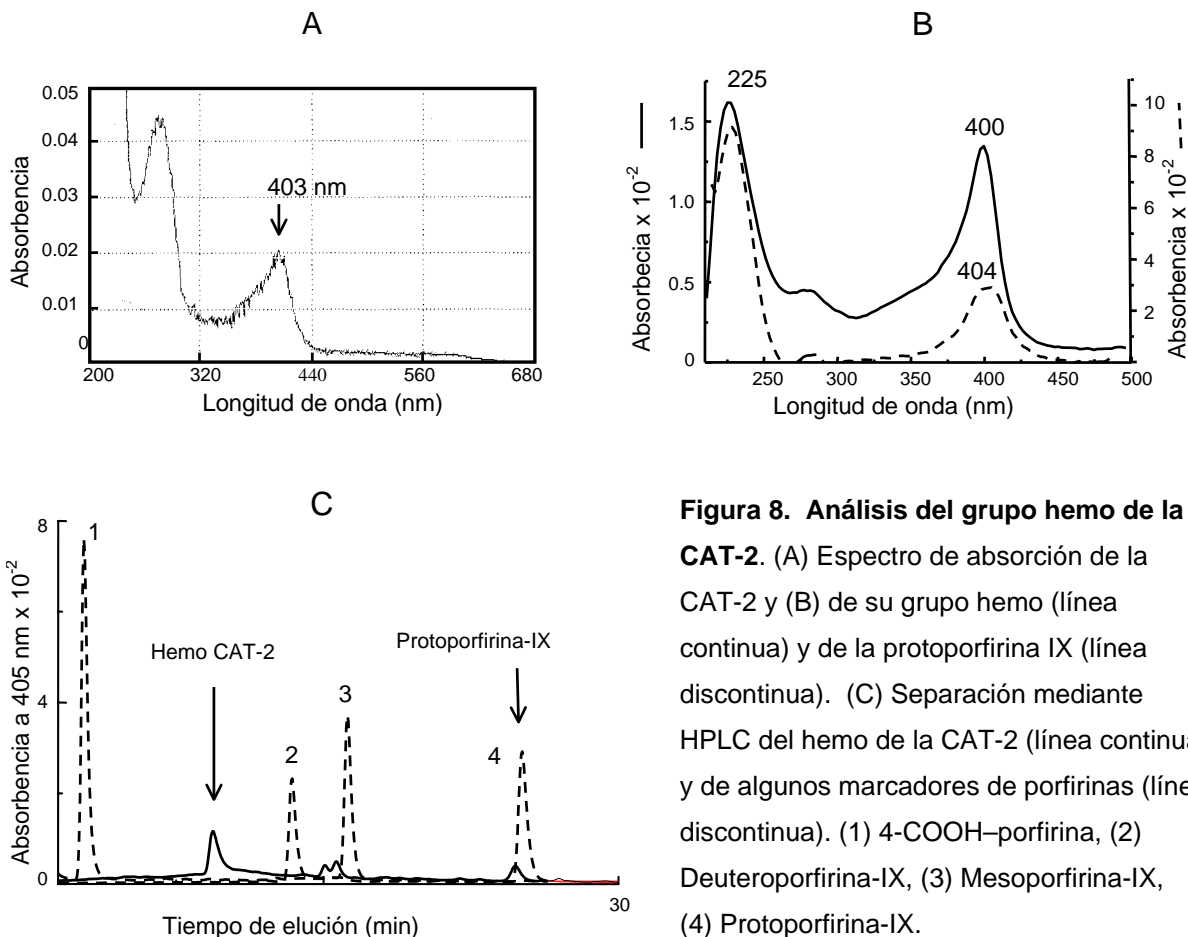


Figura 8. Análisis del grupo hemo de la CAT-2. (A) Espectro de absorción de la CAT-2 y (B) de su grupo hemo (línea continua) y de la protoporfirina IX (línea discontinua). (C) Separación mediante HPLC del hemo de la CAT-2 (línea continua) y de algunos marcadores de porfirinas (línea discontinua). (1) 4-COOH-porfirina, (2) Deuteroporfirina-IX, (3) Mesoporfirina-IX, (4) Protoporfirina-IX.

Las actividades catalíticas de la CAT-2

La CAT-2 es una enzima bifuncional, tiene actividad de catalasa y de peroxidasa. La enzima utilizó como agentes reductores a la *o*-dianisidina, la diaminobencidina, el guaiacol, el ABTS (ácido 2,2'-Azino-bis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y el ascorbato, mas fue incapaz de utilizar el NADH, el NADPH, el glutatión, el citocromo *c* (Tabla 2) o el manganeso (Mn^{II}). La enzima tampoco tuvo actividad de oxidasa ante el NADH o el NADPH. Por otra parte, además del H₂O₂, es capaz de reducir los peróxidos orgánicos como el *ter*-butil hidroperóxido (no se muestra).

Tabla 2. Actividades catalíticas de la CAT-2.

Sustrato	Actividad específica (U/μg ¹)
Catalasa	
H ₂ O ₂ (2 mM)	9.60 ± 0.30
Peroxidasa (con 1mM de H ₂ O ₂)	
<i>o</i> -dianisidina (1 mM)	1.59 ± 0.08
guaiacol (1 mM)	1.30 ± 0.40
ascorbato (0.5 mM)	0.47 ± 0.07
diaminobencidina (1 mM)	0.13 ± 0.01
NADH (1 mM)	NR ²
NADPH (1 mM)	NR
glutatión (1 mM)	NR
citocromo <i>c</i> (40 μM)	NR

¹ μg de proteína

² NR - no se detectó reacción

En una curva de saturación con sustrato se observa que la actividad de catalasa de la enzima no se inhibe con altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (0.5 y 1 M) (Fig. 9 A). Ajustando los datos de la actividad de la CAT-2 en función de la concentración del H₂O₂ a una cinética tipo *Michaelis–Menten* (Fig. 9 A y B, línea azul) se obtuvieron las siguientes constantes cinéticas aparentes: V_{\max} 45.6 ± 1.9 U/μg, K_m 13.0 ± 2.6 mM y k_{cat} 1.27 × 10⁵ s⁻¹. La eficiencia catalítica calculada de la enzima k_{cat}/K_m fue de 1 × 10⁷ M⁻¹ s⁻¹. Las constantes cinéticas

aparentes calculadas con base en el regráfico Lineweaver-Burk (Fig. 9 D) fueron: V_{\max} 42.19 U/ μ g, K_m 8.86 ± 2.7 mM, k_{cat} 1.12×10^5 s⁻¹ y k_{cat}/K_m 1.27×10^7 M⁻¹ s⁻¹.

Sin embargo, el ajuste de la cinética de saturación con la ecuación de *Michaelis–Menten* no concuerda bien con los valores experimentales, sobre todo en altas concentraciones de sustrato (Fig. 9 A). De manera que también realizamos los ajustes para una cinética compleja con base en la ecuación de Hill para dos componentes, que es el resultado de la adición de dos ecuaciones de Hill. En la figura 9 (A-C) se compara la curva teórica de la ecuación de *Michaelis–Menten* con las curvas obtenidas con la ecuación doble de Hill con las que mejor se ajustaron los datos. Éstas resultaron del ajuste con la ecuación doble de Hill sin cooperatividad y con cooperatividad con números de Hill $n_{H(1)} = 1$ y $n_{H(2)} = 1.37$ para el primer y segundo componentes, respectivamente. Los parámetros que se obtuvieron con estas dos ecuaciones se comparan en la Tabla 3 y las curvas teóricas para cada uno de los componentes de la ecuación se muestran en la figura 9 C. Es difícil definir si el segundo componente tiene o no cooperatividad, ya que el ajuste con ambas ecuaciones ($n_{H(2)} = 1$ ó $n_{H(2)} = 1.37$) concuerda de manera semejante con los datos experimentales (Fig. 9 y Tabla 3) y los valores residuales del ajuste (la diferencia entre los datos experimentales y la curva teórica) fueron parecidos (Fig. 9 A y B, gráfica inferior). Dado lo anterior y debido a que los datos estadísticos son ligeramente mejores sin cooperatividad es preferible suponer que no hay cooperatividad.

Tabla 3. Parámetros cinéticos y estadísticos del ajuste de la curva de saturación de la actividad de catalasa de la CAT-2.

	<i>Michaelis–Menten</i>	Hill (dos componentes)	
		Sin cooperatividad ($n_{H(1)}$ y $n_{H(2)} = 1$)	Con cooperatividad ($n_{H(1)} = 1$; $n_{H(2)} = 1.37$)
$S_{0.5(1)}$ (K_m) (mM)	13.0± 2.6	4.54 ± 1.1	5.06 ± 1.5
$V_{\max(1)}$ (U/ μ g)	45.6 ± 1.9	29.9 ± 3.3	32.6 ± 5.1
$k_{\text{cat}(1)}$ (s ⁻¹)	1.27×10^5	8.31×10^4	9.07×10^4
$k_{\text{cat}}/S_{0.5(1)}$ (k_{cat}/K_m) (M ⁻¹ s ⁻¹)	1×10^7	1.83×10^7	1.79×10^7
$S_{0.5(2)}$ (mM)		177.6 ± 80	170.9 ± 50
$V_{\max(2)}$ (U/ μ g)		25.0 ± 2.7	19.8 ± 7.8
$k_{\text{cat}(2)}$ (s ⁻¹)		6.94×10^4	5.5×10^4
$k_{\text{cat}}/S_{0.5(2)}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)		3.91×10^5	3.22×10^5
Chi ²	11.8	1.76	1.92
R ²	0.957	0.9947	0.9948

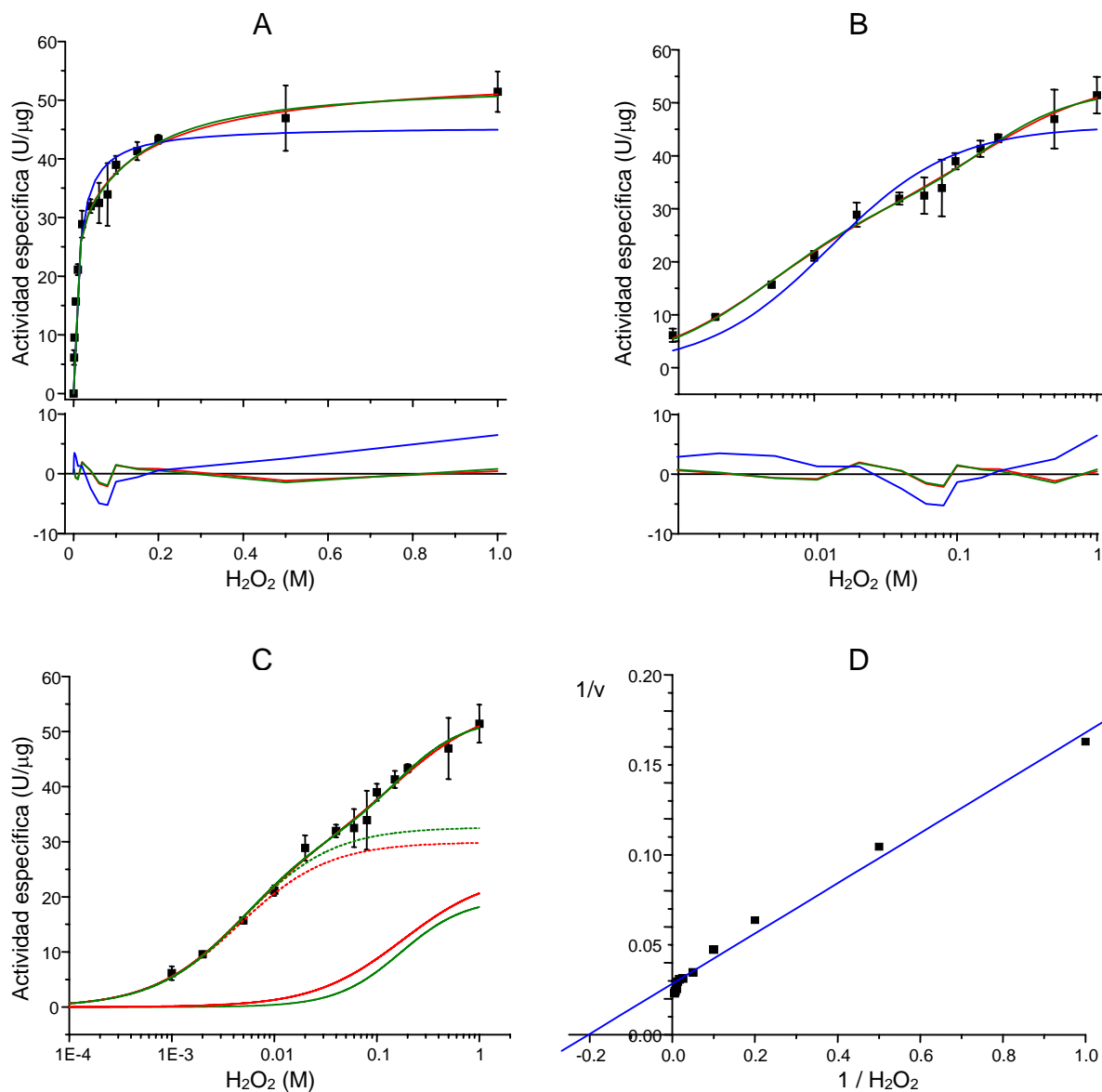


Figura 9. Cinética catalítica de la CAT-2. Cinética de saturación de la actividad de catalasa de la CAT-2 en función de la concentración de H_2O_2 (A-escala lineal, B-C escala logarítmica con base 10) y gráfico doble recíproco (Lineweaver-Burk) (D). En (A y B) se muestra el ajuste de los datos con la ecuación de *Michaelis–Menten* (línea azul), con la ecuación de Hill para dos componentes sin cooperatividad (línea roja) y con cooperatividad con números de Hill de 1 y 1.37 para el primer ($n_{\text{H}(1)}$) y segundo ($n_{\text{H}(2)}$) componentes respectivamente (línea verde). Debajo de las gráficas se muestran los valores residuales para el ajuste de cada una de las ecuaciones consideradas. En (C) se comparan las curvas teóricas para cada componente de las ecuaciones dobles de Hill ($n_{\text{H}(1)}$, línea discontinua; $n_{\text{H}(2)}$, línea continua) con y sin cooperatividad. La actividad enzimática se determinó en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.8.

La actividad de la CAT-2 en función del pH

Por otra parte, al igual que las catalasa-peroxidasas y a diferencia de las catalasas monofuncionales, la actividad de la CAT-2 fue sensible al pH. La actividad de catalasa tuvo su valor óptimo de actividad a pH 6.3 (Fig. 10 A) y la actividad de peroxidasa (con dianisidina y H_2O_2) a pH 4.75 (Fig. 10 B).

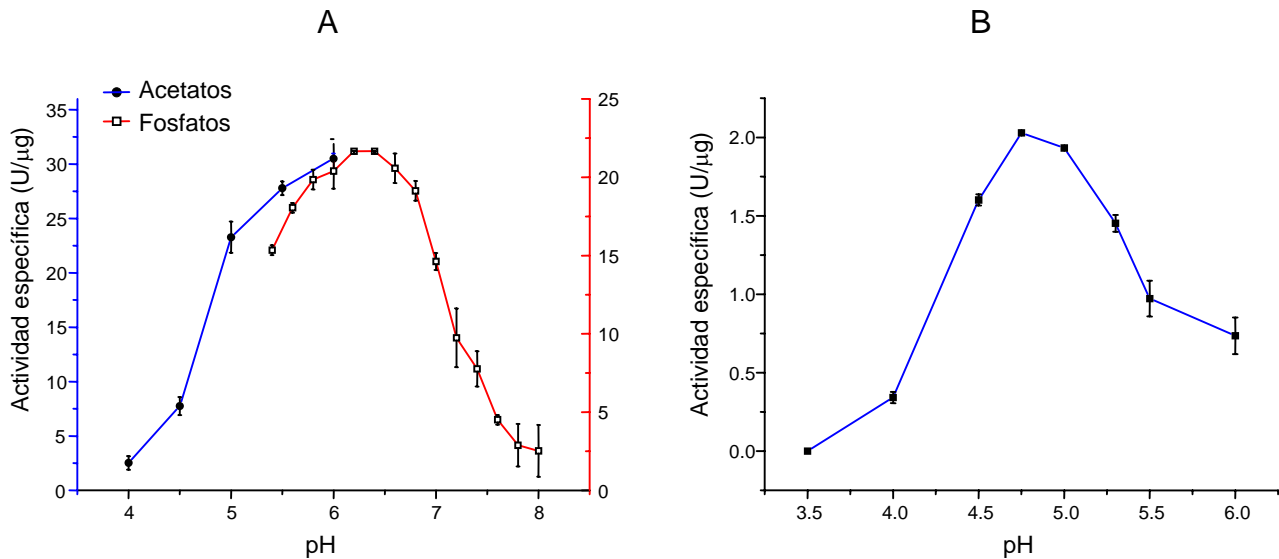


Figura 10. Efecto del pH en las actividades catalíticas de la CAT-2. Efecto del pH en la actividad específica de catalasa (A) y de peroxidasa (B). La actividad enzimática se determinó en amortiguador de acetatos (50 mM) en el intervalo de pH de 3.5 a 6.0 (línea azul) y en amortiguador de fosfatos (50 mM) entre pH 5.5 y 8.0 (línea roja). La actividad de catalasa se determinó con H_2O_2 10mM y la de peroxidasa con H_2O_2 2 mM y *o*-dianisidina 1

La inhibición de la CAT-2

Las enzimas con grupo hemo se inhiben con el cianuro. Para determinar si ambas actividades dependen del grupo hemo, evaluamos la sensibilidad de la enzima ante este inhibidor. Ambas actividades se inhibieron con el cianuro (KCN) dependiendo de la concentración y dando una cinética de segundo orden. La sensibilidad al cianuro de la actividad de catalasa fue más de 10 veces mayor (IC_{50} 14.6 μM) que la de peroxidasa (IC_{50} 168 μM) (Fig. 11 A y B).

Sabemos que las catalasas monofuncionales son inactivadas con el 3-amino-1,2,4 triazol, mientras que las catalasa-peroxidasas son poco sensibles. Determinamos la sensibilidad de la CAT-2 a este inhibidor y observamos que la enzima perdió el 50% de su actividad de catalasa después de 1 h con 3-amino triazol 20 mM. La inhibición de la enzima sigue una cinética de primer orden ($y=y_0+Ae^{-kt}$) donde k $0.0107 \pm 0.00068 \text{ min}^{-1}$ ($18.4 \pm 0.58 \text{ min}^{-1}$) (Fig. 11 C). En estas condiciones una catalasa monofuncional, como la CAT-1, es inactivada prácticamente por completo (Díaz *et al.*, 2001).

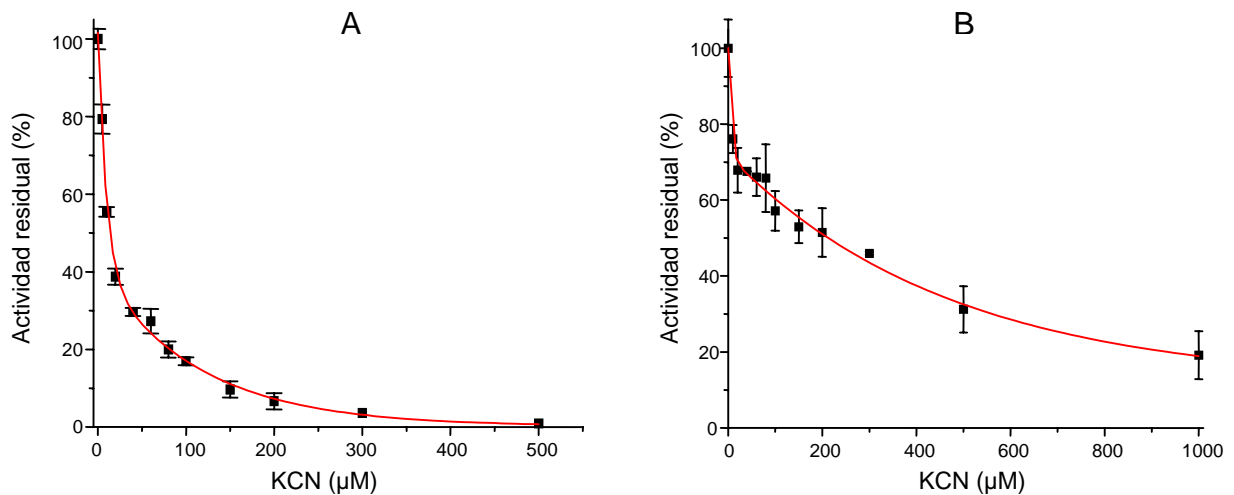
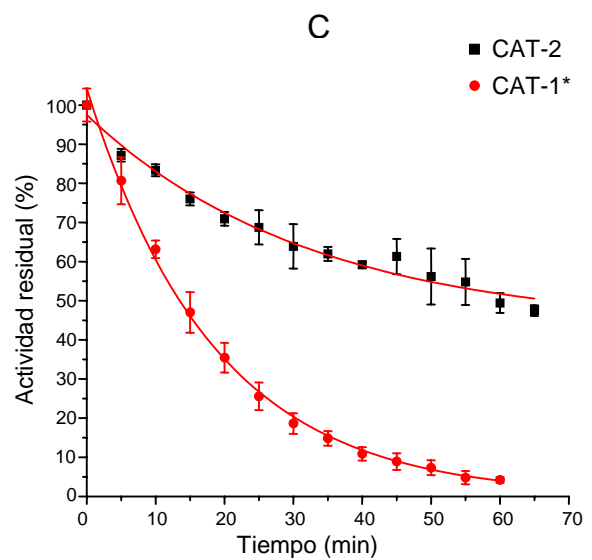


Figura 11. Inhibición de la CAT-2 con KCN y 3-amino triazol. Actividad relativa de catalasa (A) y de peroxidasa (B) de la CAT-2 en presencia de diferentes concentraciones de KCN. La enzima se incubó 1 min con el inhibidor y después se determinó la actividad de catalasa con H_2O_2 10 mM (pH 6.8) y la de peroxidasa con H_2O_2 2 mM y dianisidina 1 mM (pH 5.5). (C) Ensayo de inactivación temporal de la actividad de catalasa de la CAT-2 en presencia de 20 mM de 3-amino triazol. *Se compara la cinética de inactivación de una catalasa monofuncional de *N. crassa* (CAT-1) (Díaz *et al.*, 2001).



Secuenciación de un péptido interno de la CAT-2

La secuencia de aminoácidos de un péptido tríptico de la CAT-2 pura se determinó en el *Laboratoire de Microséquençage des Protéines* del Instituto Pasteur (París, Francia) por Jacques d'Alayer. La secuencia obtenida fue:

L-T-N-D-Y-F-V-N-L-L-D-T-N-T-A-(W)-K

Esta secuencia tiene similitud con las secuencias conocidas de las catalasa-peroxidasas de procariontes y se encontró que forma parte de la secuencia de aminoácidos predecible del ADNc parcial NCM6H12T3 de *N. crassa* (Fig. 12) que está depositada en la base de datos de las secuencias de nucleótidos (*GenBank* AA901970) (Nelson *et al.*, 1997). Con base en esta información, fue posible clonar el gen y definir la identidad de la CAT-2.

NCM6H12T3	²⁷⁰ GGCAAGCTTACCAATGACTACTTTGTCAACCTGTTGGACACCAACACGGCATGGAAGGCG ³²⁹
Proteína	G N L T N D Y F V N L L D T N T A W K A
Péptido CAT-2	- - L T N D Y F V N L L D T N T A W K -

Figura 12. Secuencia de una porción interna de la CAT-2. Se determinó la secuencia de aminoácidos de un fragmento tríptico de la CAT-2 pura (Péptido CAT-2). Esta secuencia es idéntica a un segmento de la secuencia de aminoácidos predecible del ADNc parcial NCM6H12T3 de *N. crassa* (sólo se muestran los nucleótidos 270 a 329) que tiene similitud con las catalasa-peroxidasas.

La clonación del ADNc *cat-2*

Además de la secuencia NCM6H12T3, existen dos secuencias más de segmentos de ADNc de *N. crassa* que mostraron similitud con las catalasa-peroxidasas de procariontes; de ellas, la secuencia codificada por el ADNc NCM10B4T3 tiene similitud con el extremo N-terminal de las catalasa-peroxidasas por lo que predeciblemente se encuentra localizada en el extremo 5' del gen *cat-2*. Con base en esta secuencia se diseñó el oligonucleótido específico *cat-2/5E* y se clonó ADNc del gen *cat-2* con una amplificación a partir de su extremo 3'.

La estructura del gen *cat-2*

Clonamos y secuenciamos el ADNc del gen *cat-2* (2705 pb) y la información de esta secuencia fue depositada en el banco de genes ([AF459787](#)). Al tiempo que estos experimentos se concluyeron, se liberó el primer ensamble de la secuencia del genoma de *N. crassa*, de manera que la secuencia del gen se obtuvo, en un principio, de la base de datos genómicos (*Neurospora Sequencing Project. Whitehead Institute/MIT*, actualmente *Broad institute*) (Galagan *et al.*, 2003). El gen se localizó en el *contig* 2.407 (actualmente 3.330) y el marcador más cercano fue *poi-2* del cromosoma VII. El análisis y la comparación de las secuencias cromosomal y del ARNm revelaron un marco de lectura abierto sin intrones que codifica para una proteína de 753 aminoácidos (Fig. 13) con un peso molecular de 83.4 kDa. El ARNm *cat-2* incluye dos regiones no traducibles en sus extremos 5' (por lo menos 53 pb) y 3' (364 pb) y en esta última se detecta una posible secuencia de poli-adenilación. Como esperábamos, la secuencia de aminoácidos del péptido interno de la CAT-2 se encontró en la secuencia codificada por el gen *cat-2* (recuadro en la figura 13), demostrando que el gen *cat-2* codifica para la proteína CAT-2.

La secuencia de aminoácidos de la CAT-2 mostró una gran similitud con las catalasa-peroxidasas de las bacterias (Tabla 4). En ella se pueden observar los aminoácidos conservados en las catalasa-peroxidasas que son importantes para la catálisis de la enzima y para la coordinación del grupo hemo (Fig. 13, indicados con *).

Al igual que en las catalasa-peroxididasas de los procariontes, los aminoácidos conservados y esenciales del sitio activo (Arg 87, Trp 90, His 91y Asn 121) y los que son necesarios para coordinar el grupo hemo (His 279, quinto ligando del hemo y Asp 389) están presentes sólo en el dominio N-terminal por lo que la actividad enzimática debe residir en él. La diferencia más notable con respecto a la mayoría de las catalasa-peroxididasas es una inserción de 26 aminoácidos que presumiblemente se localiza en el asa LL1 (Fig. 13 y Fig. 33 D-F). Esta asa se localiza entre las hélices D y E y está formada por alrededor de 40 aminoácidos que no están presentes en las otras peroxididasas de plantas, hongos y bacterias. Sin embargo, se encuentra una inserción semejante a la de la CAT-2 en algunas catalasa-peroxididasas de los hongos así como en las de las bacterias *Xylella*, *Xanthomonas*, *Burkholderia* y *Pseudomonas*.

Tabla 4. Porcentaje de identidad de aminoácidos que muestran algunas catalasa-peroxididasas con la CAT-2 de *N. crassa*.

<i>Podospora anserina</i>	77	<i>Xylella fastidiosa</i>	62
<i>Magnaporthe grisea</i>	74	<i>Caulobacter crescentus</i>	61
<i>Aspergillus fumigatus</i>	71	<i>Magnaporthe grisea 2</i>	61
<i>Penicillium marneffeii</i>	71	<i>Mesorhizobium loti</i>	60
<i>Blumeria graminis</i>	69	<i>Streptomyces reticuli</i>	59
<i>Aspergillus nidulans</i>	67	<i>Escherichia coli</i> (HPI)	55
<i>Burkholderia fungorum</i>	67	<i>Fusarium graminearum 2</i>	55
<i>Ustilago maydis</i>	66	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	55
<i>Fusarium graminearum</i>	65	<i>Salmonella typhimurium</i>	54
<i>Xanthomonas campestris</i>	65	<i>Escherichia coli</i> (plásmido)	53
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	65	<i>Haloarcula marismortui</i>	52
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	64	<i>Halobacterium salinarum</i>	52
<i>Pseudomonas putida</i>	64	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	51
<i>Pseudomonas syringae</i>	63	<i>Synechococcus sp.</i>	50
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	63	<i>Synechocystis sp.</i>	49
<i>Burkholderia cepacia</i>	62	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	35

En negro se muestran las enzimas de las bacterias, en verde las de las arqueobacterias y en azul las de los hongos.

Neurospora	-----MSECPVRK---SNVGGGTRNHDWPAQLRLNLRQHTPVSNPLDKDFDYAAAFKSLDYEGLKDKLTKLMTDSQDWWP	75
Aspergillus	-----MGSNECPYSRQ--NANIGGGQNNRDWPDLDKLNILRQHNSVSNPLDKGFDYTAAFNSLDYFGLKRDLEALMTDSQDWWP	79
Burkholderia	-----MSNEGQCPFN----HANGGGTTNRDWWPNELRLDLSQHSKTDPLDPCFNIAEAFNSLDLDAALRKDLAALMTDSQDWWP	76
E. coli HPI	MSTSDDIHNTTATGKCPFHQGGHQSAGAGTTTRDWWPNQLRVLDLNLQHSNRSNPLGDFDYRKEFSKLDYYGLKDKLKALLTESQPWWP	90
Archaeoglobus	-----MMRQGGVMVG-----ARKRWIT--DWPNRLNLKILRQ--LQNPYGEDYDVEEVENLDIDAVIRDLKELMRSSQDWWP	71
Consensus	-----G CP --- GGGTTNRDWWPN LRL ILRQH SNPLD DFDY AF SLDY GLKDKL ALMTDSQDWWP	55
	* ** *	
Neurospora	ADFGHYGGLFIRM ^A WHSAGTYRVTDGRGGGGEGQQRFAPLNSWPDNVSLDKARRLLWPIKQYGNKISWSDLLLITGNVALES ^M GFKTFG	165
Aspergillus	ADFGHYGGLFIRM ^A WHSAGTYRVFDGRGGGGQQRFAPLNSWPDNVSLDKARRLLWPIKQYKSKI ^S WADLLILAGNVALES ^M GFKTFG	169
Burkholderia	ADFGHYGGLFIRM ^A WHSAGTYRMGDGRGGAGRQQRFAPLNSWPDNVSLDKARRLLWPIKQYKSKI ^S WADLLILITGDVALTTMGFKTFG	166
E. coli HPI	ADWGSYAGLFI ^R MAWHSAGTYRSIDGRGGAGRQQRFAPLNSWPDNVSLDKARRLLWPIKQYKSKI ^S WADLLILAGNVALES ^M GFRTFG	180
Archaeoglobus	ADFGHYGGLFIRL ^A WHSAGSYRIFDGRGGARDGSI ^R FP ^R INWPDNINLDKAI ^R LLWPIKQYKSKI ^S WADLLILAGT ^V AMEDMGV ^K LF	161
Consensus	ADFGHYGGLFIRM ^A WHSAGTYR DGRGGAG QQRFAPLNSWPDNVSLDKARRLLWPIKQYK KISWADLLILAGNVALE MGFKTFG	140
Neurospora	FAGRPD ^T WEADESVYWGAE ^T TWLG ^N EDRYSEGQEGHEGHGVVQ ^G DESKQHTDIHNRDLQSP ^L ASSH ^M GLIYV ^N PEG--PDGIPDPV ^A SA	254
Aspergillus	FAGRSD ^T WEADQSVFWGGEKEWLG ^N DVRYLNG-----ELDNPLAASH ^M GLIYV ^N PEG--PNKNPDPV ^L AA	233
Burkholderia	YAGRED ^T WEPRD ^R VYWGSE ^T TWLG ^G DLRYDKG ^G ACESQHGGNAG-----RNLENPLAAV ^Q MDLIY--NPEG ^G PDGN ^P DPV ^A AA	243
E. coli HPI	FGAGREDV ^W EPD ^L VNWGDEKAWL ^T HRHPEA-----LAKAPL ^G ATE ^F TSGLEVIYV ^N PEG--PDHSGE ^P LSAA	242
Archaeoglobus	FALGREDIFEPDES ^P DWGP ^E EEM ^L TAKRGE--K-----EELER ^P FAATE ^M GLIYV ^N PEG--PGGN ^P DP ^L GSA	224
Consensus	FAGRED ^T WE ^P D SV WG E WLG RY----- L PLAA MGLIYV ^N PEG--PDGN ^P DPV AA	188
	*	
Neurospora	KDIRV ^T FG ^R MA ^N DEET ^V ALIAG ^H SFGK ^T HGAG ^P THHVG ^K EPEA ^P IEHQ ^G LGWANS ^F GQ ^G KGP ^D IT ^I TSGLEVI ^T W ^T PT ^K WGM ^G YLEY	344
Aspergillus	KDIRI ^T FG ^R MA ^N DEET ^V ALIAG ^H T ^F GK ^T HGAG ^P ATHL ^G KEP ^H GAG ^I E ^L O ^G LGWES ^G FES ^G TGR ^H AITS ^G LEVI ^W T ^K T ^P K ^S NQ ^F F ^E Y	323
Burkholderia	YDIR ^E V ^F GM ^A ND ^E ET ^V ALIAG ^H A ^F GK ^T HGAG ^P AD ^N V ^G LEPEA ^A GLE ^Q Q ^G LGWK ^S FG ^T GK ^G AD ^T IT ^S GLEVI ^T W ^S D ^T PT ^Q WGM ^G FF ^K N	333
E. coli HPI	AAIRAT ^F GN ^M GM ^N DEET ^V ALIAG ^H T ^L GK ^T HGAG ^P TS ^N VGP ^D PEA ^A PIE ^E Q ^G LGWAST ^Y GSG ^V GAD ^A IT ^S GLEVI ^V W ^T PT ^Q W ^S NY ^F FEN	332
Archaeoglobus	QEIRVAF ^R EM ^N DEET ^V ALIAG ^H A ^F GK ^T HGAG ^P AD ^L GP ^D SP ^S PIEM ^Q LGWK ^Y NGK ^G GS ^D IT ^S GLEVI ^T W ^S PT ^T K ^F IN ^L RI	314
Consensus	DIR TFGRMA ^N DEET ^V ALIAG ^H FGK ^T HGAG ^P A VG EPEA ^P IE Q ^G LGW FG GK ^G DTIT ^S GLEVI ^T W ^T PT ^K WGM ^G FF ^E	262
	*	
Neurospora	LYKFDW ^E PT ^K SPAGAN ^Q WAKNAE ^P TIP ^D AYDPN ^K KL ^P TML ^T TDIALR ^M DPAY ^D KICR ^D YLAN ^P DKFADAFARAW ^F KL ^L HRDMG ^P RT ^R W	434
Aspergillus	LFKYDW ^E LTKSPAGAH ^Q YVAKGVE ^F IPDP ^F DSIK ^H PPR ^M L ^T DL ^S LR ^Y DP ^E YEKISR ^R FL ^E NP ^D QFADAFARAW ^F KL ^L THRDV ^G PRV ^L Y	413
Burkholderia	LFGEW ^E LTKSPAGAH ^Q WAKNAE ^P TIP ^H AHD ^S SK ^L L ^P TML ^T DL ^S LR ^F DP ^V YEKISR ^H FMD ^N PD ^V FADAFARAW ^F KL ^L THRDMG ^P PR ^A RY	423
E. coli HPI	LFKYEW ^V QTRSPAGAI ^Q FEAVDA ^P EIIPDP ^F DSK ^K RP ^T ML ^V TDL ^T LR ^F DP ^E FEKISR ^R FL ^N DPQAFNEAFARAW ^F KL ^L THRDMG ^P K ^S RY	422
Archaeoglobus	LFTYEW ^E LEKSPAGKN ^Q WAKDA ^P EIIPDA ^H DPN ^K KHR ^P RL ^T ADLAL ^R FD ^P EFSK ^I ARR ^F LEN ^P EFEKAF ^A I ^A WY ^K L ^L THRDMG ^P K ^D CY	404
Consensus	LFKYEW ^E LTKSPAGA QWVAK AEP IPDA DSKK PTML ^T DL LRFDP ^E YEKISR ^R FL NPD FADAFARAW ^F KL ^L THRDMG ^P R ^Y	342
Neurospora	IGPEVP ^S EIL ^P WEDY ^I PPVDY ^Q IIDDNDIAAL ^K KEILAT ^G VAP ^K LIFVAW ^S ASSFRGSD ^K RGGANGARIRLAP ^Q NEW ^K VND ^P STL ^R EV	524
Aspergillus	QGPEVP ^S EVL ^I WQDP ^V PLDHP ^V IDND ^D IATL ^K KAIL ^N SG ^I SH ^T DL ^F STAWAS ^T FRGSD ^K RGGANGARIRLSP ^Q KN ^W KVNS ^Q PW ^L ES	503
Burkholderia	LGDV ^P TE ^L IWQDP ^I PAVDH ^V L ^T TRN--VAP ^L KET ^I LASGL ^S V ^A EL ^S V ^A WAS ^T FRGSD ^K RGGANGARIRLAP ^Q KD ^W AVNEP ^A RLAK ^V	512
E. coli HPI	IGPEVP ^K ED ^L IWQDP ^L PQ ^I YN ^P TE ^Q D--IIDL ^K FAI ^A D ^S GL ^S V ^S EL ^S V ^A WAS ^T FRGSD ^K RGGANGARIRLAL ^P QRD ^W VN--AAAV ^R A	509
Archaeoglobus	IGKYV ^P EET ^F VWQD ^P LPR ^R DYEL ^V DEK ^D VEEL ^K RRILAS ^G LSL ^S QL ^V YFAWAS ^T YRNS ^D RRGANGARIRL ^K PM ^S V ^E VN ^H PEL ^K KV	494
Consensus	IGPEVP E LIWQDP P DY D DIA LK ILASGLS LVS AWASASTFRGSD ^K RGGANGARIRL PQ W VN P L V	406
Neurospora	LAAL ^E SVQ ^K FND--S--SSG ^K KVSLAD ^L IVLGGVAA ^L EQAS-----GLV ^P FT ^P GRN ^D ATQ ^E HT ^D VHS ^F THLE ^P HAD ^G FR ^S YK ^G T ^K R ^V R--	606
Aspergillus	LAAL ^E KIQ ^K FND--AQ ^S TD ^K RVSLAD ^L IVLAGAAS ^L EKAARD ^A GH ^N SVS ^F TP ^G RT ^D ATQ ^E Q ^T D ^V DS ^F NN ^L E ^P IAD ^G FR ^N YGR ^G T ^P RV ^L --	591
Burkholderia	LKVL ^E RIQ ^E GFNS--T ^Q PG ^G KKISLAD ^L IVLAGGAG ^I EQA ^A KRAG ^H D ^V V ^V FPAG ^R MDASQ ^E Q ^T DA ^H SFA ^V LEP ^V AD ^G FR ^N FV ^K GFA ^V P--	600
E. coli HPI	LPVLE ^K IQE-----S--GKAS ^L ADI ^I VLAGV ^G VEKAASA ^A GLSI ^H V ^F FPAG ^R VDAR ^Q D ^T DIEM ^F ELLE ^P IAD ^G FR ^N YAR ^L D ^V ST--	590
Archaeoglobus	IAAYEKIQ ^E EFNEGAK ^S EKRIS ^I AD ^L IVLGGIA ^A VEEA ^A ARRAG ^F SVK ^V PI ^P GRVDA ^Q QEHV ^D E ^E FY ^R VEP ^F AD ^G FR ^N YFR ^Y PER ^I NE	584
Consensus	LAAL ^E KIQ EFN - S KK SLAD ^L IVLAG A E AA AG V VPF PGR DA QEQ ^T D SF LEP ADGFR ^N Y G RV -	465
Neurospora	-----TEQ ^F LID ^R AS ^L L ^T LSA ^P EL ^T ALIG ^G LRV ^L EAN ^Y DG ^S SY ^G VL ^T K ^T PK ^L <u>LINDYFVNLLDINTAWK</u> AAD ^N E ^G EV ^F I ^G Y ^D R ^K TH ^D DK	690
Aspergillus	-----TED ^F LID ^K A ^Q LL ^N LSP ^P EL ^T VLIG ^G LRV ^L NN ^Y DR ^S NL ^G V ^F TK ^R PG ^Q L ^T NDF ^F VN ^L LD ^M GV ^Q WK ^P AD ^T NE ^I F ^I GS ^D R ^K T ^G Q ^A R	675
Burkholderia	-----AEAL ^L ID ^K A ^Q LL ^T LTA ^P Q ^M TALV ^G GLR ^V LV ^N Q ^T GE ^K H ^G V ^F T ^D Q ^P ET ^L TV ^D FR ^N LLDM ^A TE ^W K ^P IA ^G --ED ^T Y ^E GR ^D R ^T G ^E L ^K	683
E. coli HPI	-----TES ^L LID ^K A ^Q LL ^T LTA ^P EM ^T ALV ^G GM ^R V ^L GAN ^F DG ^S K ^N GV ^F TR ^V GV ^L SNDF ^F VN ^L LD ^M RY ^E WK ^A T ^E SK ^E L ^F EGR ^D RET ^G E ^V K	674
Archaeoglobus	RDVY ^T TP ^E Y ^F LV ^D KAN ^L L ^T LTP ^E MV ^V LIG ^G MR ^A LGAN ^Y SH ^S DY ^G VL ^T ER ^P GV ^L SNDF ^F VN ^L LD ^M S ^V E ^W RA ^D DY ^R Y ^T FE ^G Y ^D R ^K SG ^E L ^R	674
Consensus	-----TE FLID ^K A ^Q LL ^T LTA ^P EM ^T ALIG ^G LRV ^L ANYD S GVFT RPG LTND ^F VN ^L LD ^M EWKAAD E FEG DRKTGE K	534
Neurospora	WTATR ^A D ^L I ^F GHAEL ^R ALAEV ^Y AAVD ^G E ^E K ^F K ^R DFVA ^A W ^K VM ^N LD ^R FD ^L KQEG ^R Q--NAP ^K L-----	753
Aspergillus	WKASR ^A D ^L V ^F GS ^H AEL ^R AISEV ^Y GSSD ^G EAK ^F V ^K DFVA ^A W ^K VM ^N LD ^R FD ^L KQ ^T GLA ^Q R ^I K ^P Q ^L -----	739
Burkholderia	WTGTR ^V D ^L V ^F GS ^N AV ^L RALSEV ^Y ASAD ^G EAK ^F IRDFVA ^A W ^K VM ^N LD ^R FD ^L LACK ^R RY ^I DASGL ^P GEP ^A SAR ^I Q ^W R	760
E. coli HPI	FTASR ^A D ^L V ^F GS ^N SV ^L RAVAE ^V YASS ^D AHE ^K F ^V KDFVA ^A W ^K VM ^N LD ^R FD ^L -----	726
Archaeoglobus	WRATR ^V D ^L L ^I LGH ^H DELRAVAE ^V YGC ^D DAK ^E F ^V KDFVA ^A VC ^A K ^V M ^H LDR ^F DL ^W RSNR ^K LYKE ^I TAG ^L -----	740
Consensus	WTATR ^A D ^L V ^F GS ^H AEL ^R A AEV ^Y AS DGE ^E K ^F V ^K DFVA ^A W KVM ^N LD ^R FD ^L R L-----	584

Figura 13. Alineamiento de la CAT-2 con algunas catalasa-peroxidasas representativas de los hongos, las bacterias y las arqueobacterias. La secuencia de aminoácidos de la CAT-2 de *N. crassa* fue alineada con las catalasa-peroxidasas de *A. nidulans*, *B. cepacia*, *E. coli* y *A. fulgidus*. Se muestra el péptido secuenciado (recuadro), así como algunos aminoácidos conservados e importantes para la catálisis de las catalasa-peroxidasas (*).

EL ORIGEN DEL GEN *cat-2*

Paralelamente a nuestro trabajo, se identificaron otras catalasa-peroxidasas de hongos. Debido a que estas enzimas sólo se han encontrado en los hongos y no en otros organismos eucariontes, nos llamó la atención el origen de las catalasa-peroxidasas en los hongos y realizamos un análisis filogenético para tratar de inferir las relaciones genealógicas de sus genes.

Estudiamos las relaciones genealógicas de las catalasa-peroxidasas con las citocromo *c* peroxidasas de los hongos, que son las peroxidasas más parecidas a las catalasa-peroxidasas. Para ello, obtuvimos todas las secuencias conocidas de las catalasa-peroxidasas y de dos citocromo *c* peroxidasas e hicimos un alineamiento múltiple. Debido a que las catalasa-peroxidasas se originaron de un evento de duplicación de una peroxidasa (Welinder, 1991), también hicimos un alineamiento de las citocromo *c* peroxidasas con los extremos N- y C-terminal de las catalasa-peroxidasas separados. A partir de estos alineamientos realizamos algunos análisis por los métodos de matrices de distancias, usando los algoritmos *UPGMA*, *Neighbor-joining* y *Fitch-Margoliash*. En la figura 14 se muestran los análisis obtenidos con el algoritmo *Fitch-Margoliash* para las citocromo *c* peroxidasas y las catalasa-peroxidasas con sus secuencias completas (Fig. 14 A) y con sus extremos N- y C-terminal separados (Fig. 14 B).

Por otra parte, hicimos un análisis filogenético que incluyó sólo las catalasa-peroxidasas. Con una serie de análisis preliminares con los métodos de máxima parsimonia (búsqueda heurística) y de matrices de distancias con los algoritmos mencionados, observamos que las catalasa-peroxidasas se dividieron en 8 grandes grupos cuya composición en OTU (unidad taxonómica operacional, por sus siglas en inglés) fue relativamente constante. Sin embargo, las inferencias no fueron muy robustas y la topología de estos árboles varió considerablemente dependiendo del tipo de análisis. Como una estrategia para mejorar la resolución del análisis redujimos el número de los OTU y realizamos un análisis filogenético mediante una búsqueda exhaustiva con el método de máxima parsimonia del programa *PAUP*. Para ello, seleccionamos algunas enzimas representativas de los grandes grupos antes mencionados y realineamos sus secuencias. Así, encontramos un árbol filogenético más parsimonioso en el que las catalasa-peroxidasas de los hongos se agruparon con las de β -proteobacterias como *Burkholderia* (Fig. 15 B).

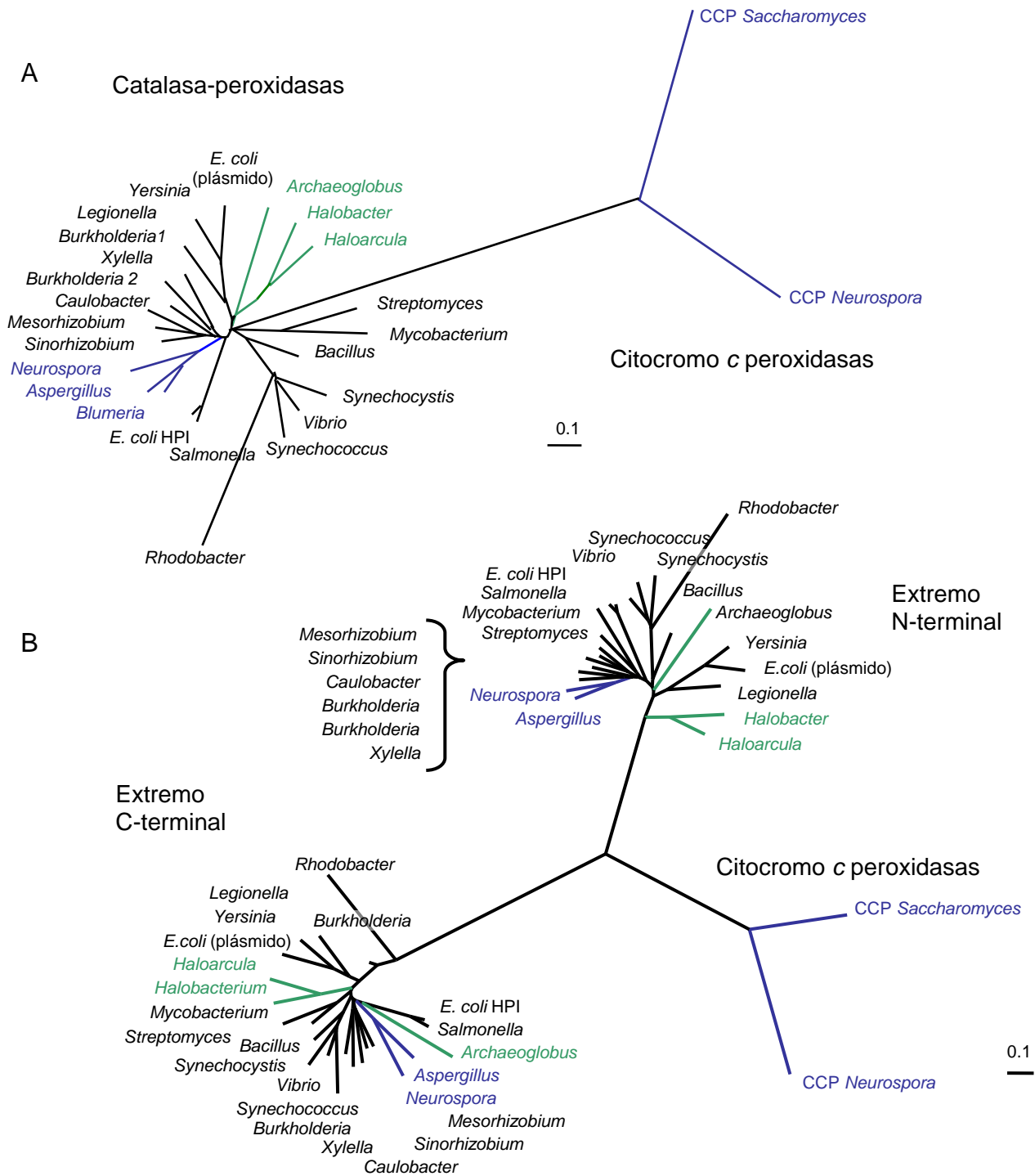


Figura 14. Análisis filogenéticos de las catalasa-peroxidasas y las citocromo c peroxidasas. (A) Redes que muestran las relaciones de similitud entre las catalasa-peroxidasas y las citocromo c peroxidasas (CCP) de los hongos y (B) entre los extremos C- y N- terminales de las catalasa-peroxidasas con las citocromo c peroxidasas. Método de matrices de distancias para proteínas, algoritmo *Fitch-Margoliash*, distancias: Dayhoff PAM 001 (*PHYLIP*). En negro se muestran las secuencias de las bacterias, en verde las de las arqueobacterias y en azul las de los hongos.

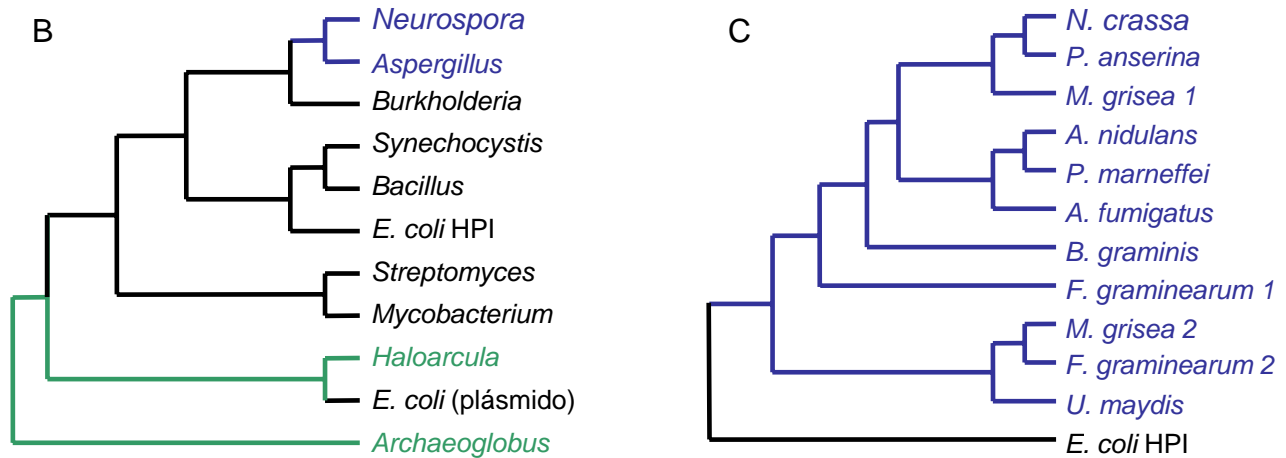


Figura 15. Análisis filogenéticos de las catalasa-peroxidasas (continuación). (B) Cladograma de las catalasa-peroxidasas en el que se han excluido algunos OTU internos. Se muestra el árbol más parsimonioso obtenido con una búsqueda exhaustiva. (C) Análisis filogenético de las catalasa-peroxidasas de los hongos en el que se incluyó como grupo externo la enzima de *E. coli*. Se muestra el árbol más parsimonioso obtenido con una búsqueda exhaustiva. En negro se muestran las secuencias de las bacterias, en verde las de las arqueobacterias y en azul las de los hongos. Todos los árboles fueron construidos con *PAUP*.

En las bases de datos de secuencias genómicas de otros hongos se encuentran catalasa-peroxidasas incluso de un linaje distinto de los ascomicetos (*U. maydis*, un basidiomiceto). Para definir las relaciones genealógicas de los genes de los hongos y mejorar la inferencia filogenética, redujimos el número de OTU y realizamos una búsqueda exhaustiva por el método de máxima parsimonia. Para ello, seleccionamos todas las secuencias de enzimas conocidas de los hongos y utilizamos como grupo externo una secuencia de una *Eubacteria*. Así, obtuvimos un árbol filogenético más parsimonioso en el que se observa que las catalasa-peroxidasas de los hongos forman dos grandes grupos. Ambos incluyen secuencias de ascomicetos (Fig. 15 C).

LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA CAT-2

Fraccionamiento celular de *Neurospora crassa*

En un inicio, dos datos nos hicieron pensar que la CAT-2 podía ser una enzima peroxisomal. Por una parte, la CAT-2 se indujo con sustratos para los que se requiere la función peroxisomal (glioxisomal) (ver la sección de la regulación de la CAT-2). Por otra parte, observamos que la secuencia de aminoácidos de la CAT-2 mostró en su extremo C-terminal un tripéptido Pro-Lys-Leu (PKL) que es semejante a la secuencia consenso Ser-Lys-Leu (SKL) de localización peroxisomal PTS-1 (del inglés *Peroxisomal Targeting Sequence* - 1) de las proteínas de la matriz de los peroxisomas. Si bien, la secuencia PKL no coincidió exactamente con la secuencia SKL, se sabe que existen variaciones sobre la secuencia PTS-1. Por ejemplo, el consenso de la secuencia PTS-1 para las proteínas peroxisomales de *N. crassa* es A/C/G/S – K/R/Q/H – I/L/V (de Zoysa y Connerton, 1994). Por ello, para entender la función de la enzima, consideramos importante estudiar su localización intracelular.

Algunos resultados previos del laboratorio que consistieron en detectar a la CAT-2 mediante la microscopía electrónica de transmisión y empleando anticuerpos policlonales indicaban que una parte de la CAT-2 se localiza en la pared celular (Montes de Oca, 1999). Sin embargo, este estudio se realizó con hifas crecidas en condiciones en las que ahora sabemos que la CAT-2 es escasa. Para complementar este estudio, llevamos a cabo experimentos de fraccionamiento celular a partir de hifas en las cuales sabemos que la CAT-2 se encuentra en abundancia. Asimismo, estudiamos estas hifas por microscopía electrónica de transmisión e intentamos realizar experimentos de inmunolocalización de la CAT-2 en ellas.

Para inducir a la CAT-2, el hongo se creció en medio MV/sacarosa por 14 h y después se transfirió a medio MV con acetato o con oleato. Observamos que en ambos casos la máxima acumulación de la CAT-2 ocurrió 24 h después de la transferencia al sustrato inductor (Fig. 16 A). También medimos la actividad de la isocitratoliasa para evaluar el metabolismo peroxisomal y encontramos que esta actividad aparece y aumenta con mayor rapidez que la CAT-2, de tal forma que la mayor acumulación de la CAT-2 no coincidió con la aparición de la función peroxisomal (Fig. 16 B).

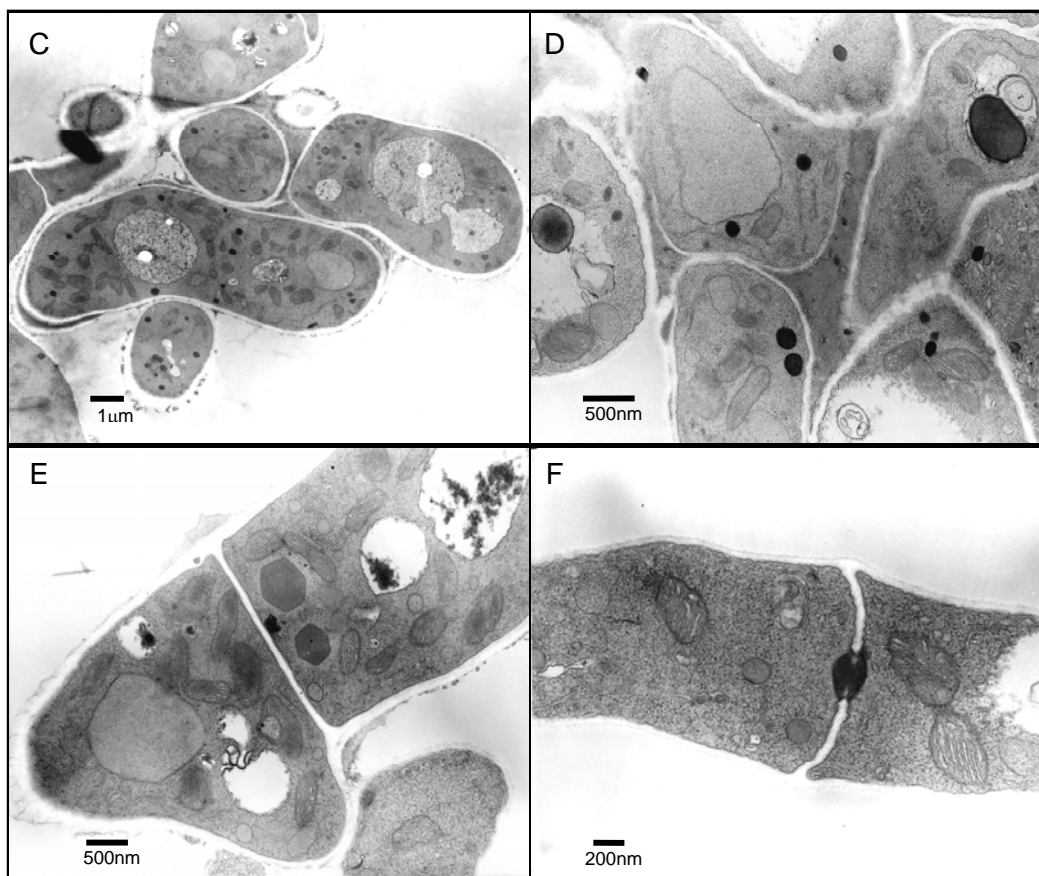
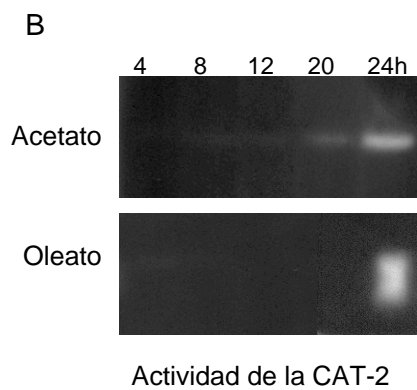
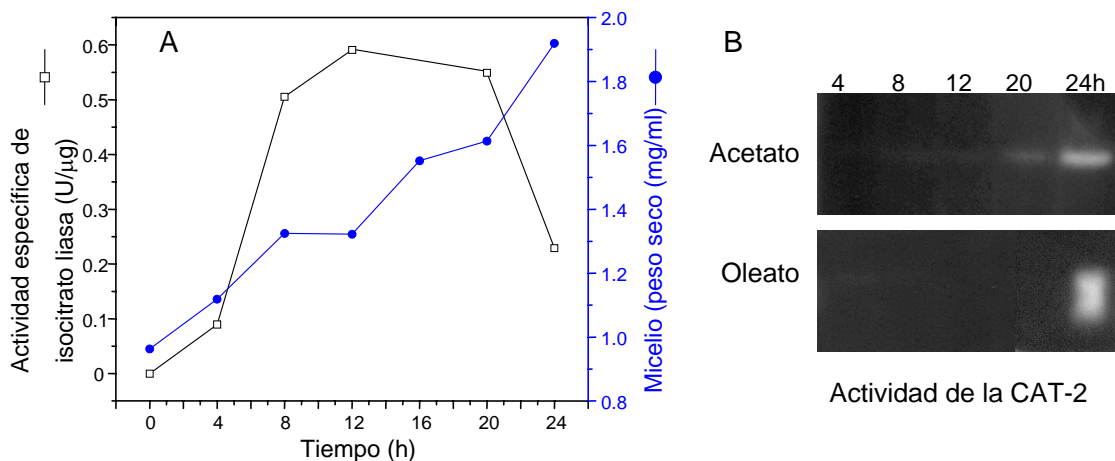


Figura 16. Inducción de la CAT-2 y de la función peroxisomal. El hongo se creció en medio MV/sacarosa (14h) y después se transfirió a medio MV/acetato (oleato). (A) Biomasa del hongo a diferentes tiempos (ordenadas, eje derecho) y actividad de la isocitrato liasa (ordenadas, eje izquierdo). (B) Acumulación de la CAT-2 en zimogramas de catalasa. (C-F) Morfología de las hifas (24h post-inducción) por microscopía electrónica de transmisión. En (A, C-F) sólo se muestran los resultados obtenidos con acetato.

Estudiamos la constitución subcelular del micelio en cortes de las hifas inducidas con acetato (24 h). En estas condiciones fueron evidentes los peroxisomas, las mitocondrias, así como numerosas vacuolas y los cuerpos de *Woronin* (Fig. 16 C y F). Llevamos a cabo ensayos para inmunolocalizar la CAT-2 en estas células. Para ello, las hifas del hongo se incluyeron en una resina acrílica, se incubaron con un anticuerpo primario anti-CAT-2 y después con la proteína A-oro y se observaron con microscopía electrónica de transmisión. A pesar de probar varias condiciones experimentales, mediante este sistema no fue posible determinar una localización específica para la enzima; las partículas de oro detectadas mostraron una distribución dispersa. Por ello, también hicimos experimentos de fraccionamiento celular mediante una centrifugación en gradientes continuos de sacarosa.

Las hifas de *N. crassa* tienen dos poblaciones de peroxisomas con densidad diferente. Una de ellas tiene densidad de 1.26 g/cm³ y la segunda, que propiamente corresponde a los glioxisomas, de 1.21 g/cm³. La densidad de las mitocondrias es de 1.19 g/cm³ (Kionka y Kunau, 1985). Realizamos el fraccionamiento celular en un gradiente de sacarosa (30 - 60%) que comprendió este intervalo (1.137 - 1.29 g/cm³). Para definir la localización de las estructuras subcelulares, medimos la actividad de la isocitrato liasa, como marcador glioxisomal; de la urato oxidasa como marcador peroxisomal y de la fumarasa como marcador de las mitocondrias. Para eliminar la pared celular, los experimentos se hicieron a partir de protoplastos.

Cuando el micelio se indujo con acetato (Fig. 17 A-C), la actividad de catalasa mostró una meseta de actividad en las fracciones comprendidas entre las densidades de 1.191 y 1.255 g/cm³; sin embargo, la mayor actividad de catalasa sedimentó en densidades menores de 1.168 g/cm³ (fracciones 27-31) con el máximo a 1.117 g/cm³ (Fig. 17 A). La actividad de la CAT-2 se detectó en estas fracciones (Fig. 17 E). La fracción subcelular con la máxima actividad de la isocitrato liasa sedimentó a una densidad de 1.218 a 1.224 g/cm³ (con un pico menor de 1.23 g/cm³) (Fig. 17 B). La fracción con actividad de fumarasa, por su parte, fue menos compacta y estuvo dispersa en fracciones con una densidad de 1.191 g/cm³ a 1,233 g/cm³ observándose el máximo de la actividad a 1.224 g/cm³ (Fig. 17 C). En este experimento no fue posible detectar actividad de la urato oxidasa; sin embargo, esta actividad fue evidente cuando la función peroxisomal se indujo con ácido oléico. En un experimento equivalente pero hecho a partir del micelio inducido con ácido oléico, la actividad de la urato oxidasa sedimentó en dos fracciones con densidades de 1.191 a 1.209 g/cm³ y de 1.263 a 1.28 g/cm³ respectivamente (Fig. 17 D). En este experimento, la CAT-2 también sedimentó en las fracciones de densidad menor a 1.12 g/cm³. Estos resultados indican que la CAT-2 está asociada con la fracción microsomal de los gradientes y sugieren que la enzima es citosólica.

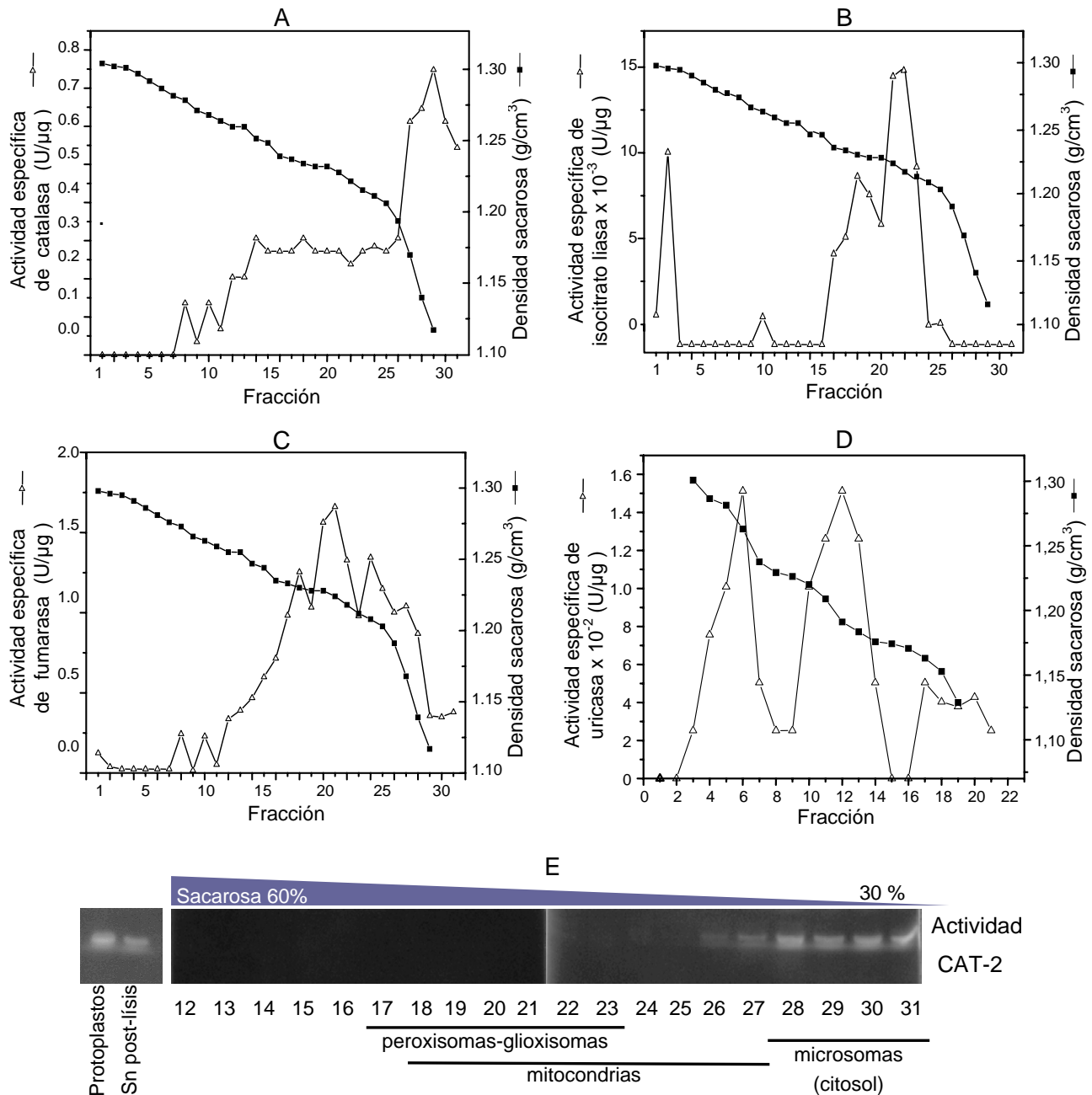


Figura 17. Fraccionamiento celular de *N. crassa*. Se obtuvieron protoplastos a partir de micelio inducido en acetato (oleato) (E, carriles 1 y 2) y las estructuras subcelulares se sometieron a centrifugación en un gradiente de sacarosa (30-60%). El gradiente se fraccionó, se determinó su densidad (línea ■, eje derecho de las ordenadas) y las siguientes actividades enzimáticas (línea △, eje izquierdo de las ordenadas): (A) catalasa, (B) isocitrato liasa (marcador glioxisomal), (C) fumarasa (marcador mitocondrial) y (D) uricasa (marcador peroxisomal). (E) Actividad de CAT-2 en zimogramas de catalasa. La actividad de uricasa mostrada en (D) proviene de un fraccionamiento hecho a partir del micelio inducido con ácido oléico.

LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA CAT-2

La regulación de la expresión de la CAT-2 durante el crecimiento

Estudiamos la regulación de la expresión de la CAT-2 mediante hibridaciones de tipo *Northern* y con zimogramas de actividad de catalasa. El ARNm *cat-2* se detectó hibridando el ARN con una sonda de 2.4 kb del ADNc *cat-2* mientras que la actividad de la CAT-2 se identificó por su movilidad electroforética. Se sabe que el oxígeno en singulete puede oxidar la CAT-2 y consecuentemente generar isoformas con movilidad electroforética distinta (ver las figuras 19 B y 21) (Lledías *et al.*, 1998); sin embargo, la movilidad de estas isoformas no coincide con la de las otras catalasas.

Durante el crecimiento del hongo en medio MV/sacarosa en cultivos líquidos, la actividad de la CAT-2 aparece en la etapa del crecimiento estacionario (Fig. 18 B). No se detectó el ARNm *cat-2* ni la actividad de la enzima en el micelio de la etapa de crecimiento exponencial (6-18 h). Ambos aparecieron en la etapa de crecimiento pre-estacionario (24 h). La acumulación del transcrito *cat-2* aumentó después y se mantuvo con niveles relativamente constantes hasta la etapa tardía del crecimiento estacionario (Fig. 18 C). La actividad de la CAT-2 coincidió con la acumulación del transcrito durante el crecimiento, lo que sugiere que la regulación de la CAT-2 en estas condiciones ocurre principalmente a nivel transcripcional.

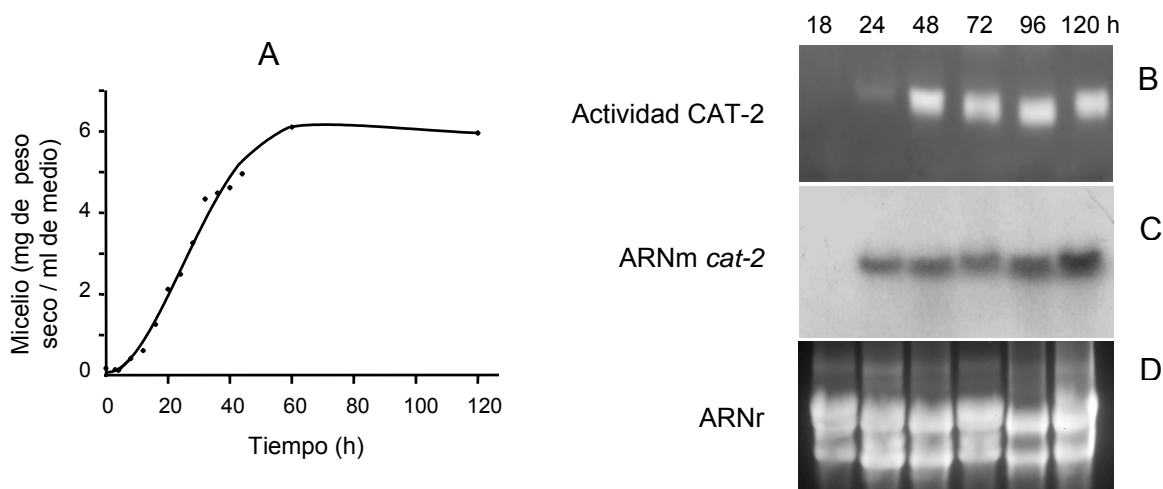


Figura 18. Regulación de la CAT-2 durante el crecimiento. *N. crassa* fue crecido en medio MV/sacarosa líquido y se colectaron muestras a diferentes tiempos para obtener las proteínas solubles y el ARN total. (A) Crecimiento del hongo, (B) zimograma de actividad de catalasa, (C) hibridación de tipo *Northern*. El zimograma de actividad fue cargado con 500 μ g de proteína total. El análisis de *Northern* se hibridó con una sonda del gen *cat-2*. (D) Se muestra el ARN ribosomal (ARNr) teñido con bromuro de etidio como control de cargado.

La regulación de la CAT-2 durante diferentes condiciones de tensión

La actividad de la CAT-2 durante el crecimiento aumentó cuando se reemplazó la sacarosa por fuentes de carbono cuyo metabolismo genera especies reactivas de oxígeno, como el metanol y el ácido úrico. La enzima también se indujo cuando el hongo creció en otros sustratos tales como los ácidos grasos (ácido oléico), el etanol y el acetato. Esta inducción se observó tanto en cultivos sólidos como en cultivos líquidos, aunque con diferentes niveles (Fig. 19 A y B, respectivamente).

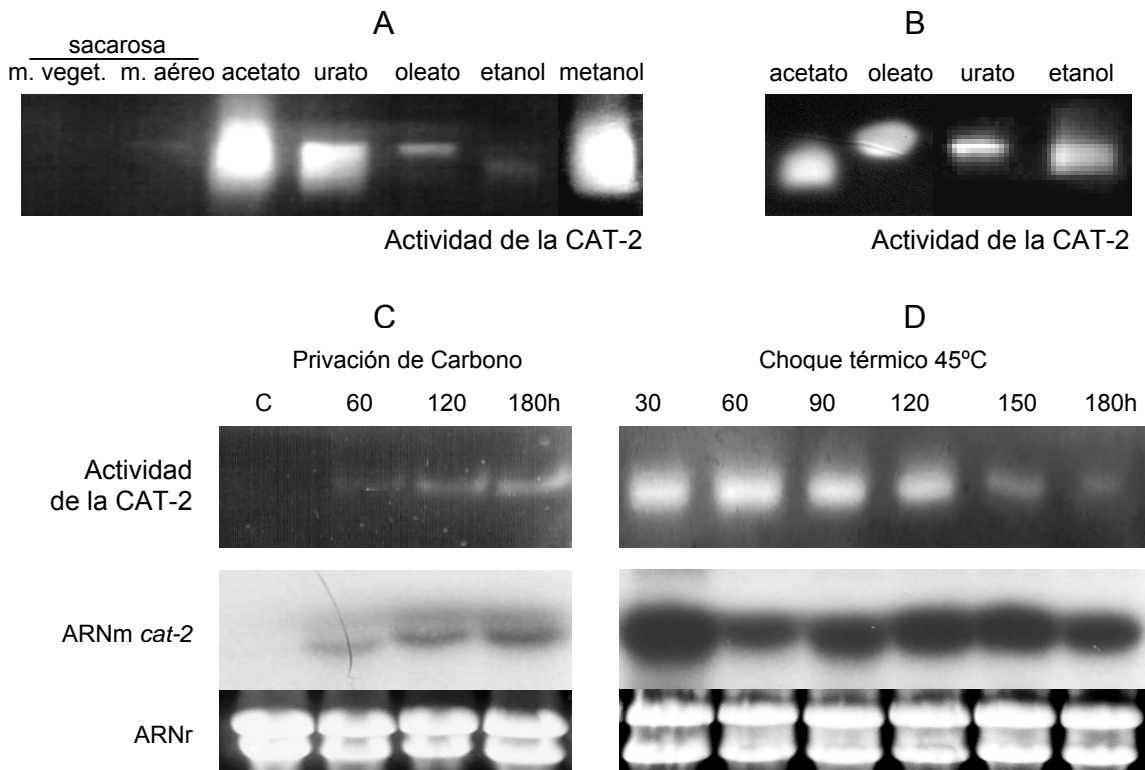


Figura 19. Regulación de la CAT-2 durante condiciones de estrés. (A) Zimograma de actividad de catalasa (50 μ g de proteína total) de micelio de *N. crassa* crecido en medio MV-agar con sacarosa (micelio vegetativo, carril 1; micelio aéreo, carril 2), acetato, urato, oleato, etanol (5 días) o con metanol (7 días). (B) Zimograma de actividad de catalasa (150 μ g de proteína total) de micelio crecido hasta la etapa del crecimiento pre-estacionario en medio MV-líquido con acetato, urato, oleato o etanol. Micelio del crecimiento exponencial transferido a medio MV sin fuente de carbono (C) o a medio MV/sacarosa a 45°C (D). Se colectaron muestras del cultivo a diferentes tiempos y se analizaron mediante zimogramas de actividad de catalasa e hibridaciones de tipo *Northern* (como se describe en la Fig. 16 C).

La privación de carbono, *per se*, también indujo la CAT-2 aunque con menor intensidad. Cuando el micelio de la etapa exponencial del crecimiento se transfirió a medio MV desprovisto de fuente de carbono se observó la acumulación del transcrito *cat-2* y de la actividad de la enzima después de 1 hora de la transferencia. La actividad aumentó moderadamente después de 3 horas (Fig. 19 C). En cambio, no se observó inducción de la CAT-2 cuando el micelio se privó de nitrógeno (no se muestra el experimento).

La condición en la que más fuertemente se indujo la CAT-2 fue después de un choque térmico. Cuando el micelio en crecimiento exponencial crecido a 30°C fue transferido a 45°C se observó una rápida inducción de la CAT-2. La acumulación del ARNm *cat-2* alcanzó sus niveles máximos después de 30 minutos de la transferencia. Estos niveles se mantuvieron, con un pequeño decremento, después de 3 horas y un patrón semejante se observó para la actividad de la CAT-2 (Fig. 19 D).

La CAT-2 no se indujo con el estrés osmótico generado con altas concentraciones (1 - 1.2 M) de sorbitol o de NaCl, ni tampoco en las condiciones de tensión oxidativa que se generan al crecer al hongo en presencia de *paraquat* (1 - 51 mM), un agente generador de O_2^- (no se muestran los experimentos).

La regulación de la expresión de la CAT-2 durante el desarrollo asexual

Estudiamos la regulación de la CAT-2 durante el desarrollo asexual del hongo. El proceso de conidiación se indujo al exponer al aire micelio de la etapa del crecimiento exponencial crecido en medio líquido. Las hifas que están directamente expuestas al aire se adhieren durante los primeros 40 minutos y a partir de éstas emergen las hifas aéreas (conidióforos) alrededor de 2 horas después. Los conidióforos continúan creciendo hasta que en sus ápices se forman los conidios después de 9 horas. Se hicieron experimentos de este tipo y se colectaron y analizaron muestras del hongo en diferentes tiempos. Se observó que el ARNm *cat-2* se comienza a acumular cuando las hifas aéreas se empiezan a formar (3 h de la exposición al aire) aunque a un nivel bajo. El nivel aumentó considerablemente antes de la aparición de los conidios (7 h) y se mantuvo durante la formación de éstos (10 h) (Fig. 20 A). La actividad de la CAT-2 se pudo detectar después de 7 h y coincidió con el aumento en la acumulación del ARNm; sin embargo, la actividad CAT-2 fue baja (comparar la cantidad de proteína cargada por zimograma en las figuras 19 y 20).

Para simular las hifas del micelio que no entran en contacto con el aire y que no se diferencian, se llevó a cabo un experimento que consistió en separar dos capas de micelio con un papel filtro; la capa superior quedó expuesta al aire mientras que la inferior quedó aislada del

aire por la capa superior. Mediante este sistema se observó que la inducción de la CAT-2 no ocurre a menos que se induzca la conidiación (Fig. 20 B, carril 1, micelio de 8 h no expuesto al aire). Por otra parte, aislamos las estructuras celulares diferenciadas del proceso de conidiación (micelio adherido, micelio aéreo y conidios) y analizamos la presencia de la CAT-2 y su transcrito en ellas (Fig.20 B). Mostramos que ambos, el ARNm y la enzima estuvieron presentes tanto en el micelio aéreo como en los conidios, siendo más abundantes en los últimos.

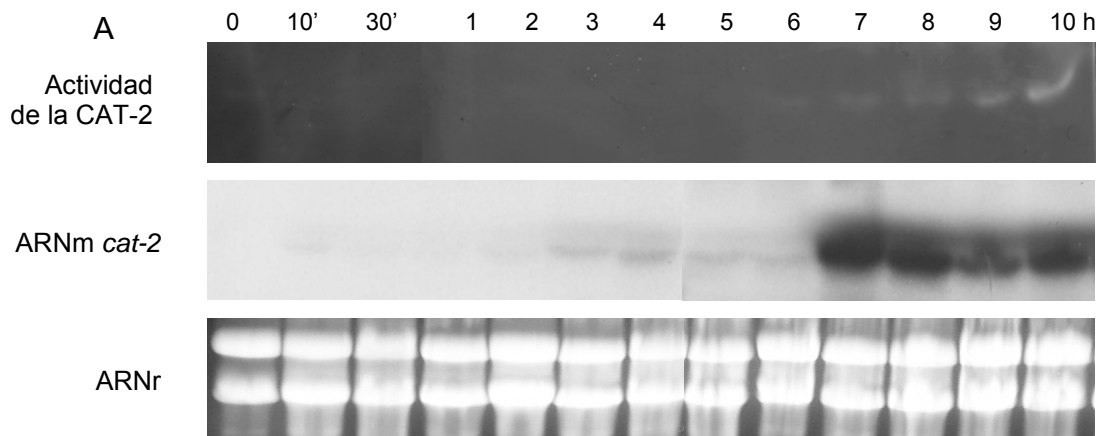
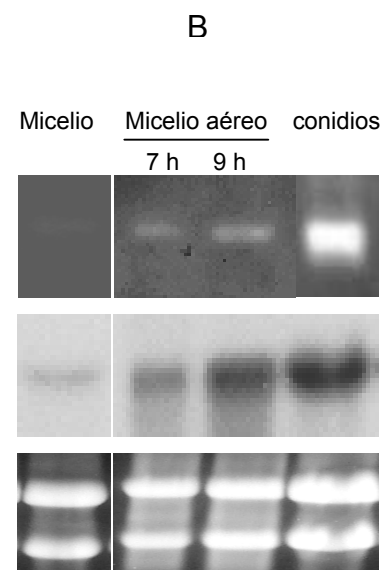


Figura 20. Regulación de la CAT-2 durante la conidiación. Micelio en crecimiento exponencial fue filtrado y expuesto al aire para inducir el proceso de conidiación. (A) Actividad de la CAT-2 y acumulación del ARNm *cat-2* en el micelio colectado a diferentes tiempos. El tiempo cero es el micelio sin filtrar. (B) Actividad de la CAT-2 y acumulación del ARNm *cat-2* en las diferentes estructuras del proceso de la conidiación: micelio que no estuvo expuesto al aire (8 h), micelio aéreo (7 y 9 h) y conidios aislados (24 h). La CAT-2 se analizó por zimogramas de catalasa (panel superior) y el ARN por hibridaciones de tipo *Northern* (panel central) con el ARNr como control de cargado (panel inferior). El zimograma se cargó con 1200 μg de proteína por carril en (A) y con 300 μg en (B).



También observamos que la inducción de la CAT-2 durante la conidiación ocurre de manera dependiente de la temperatura. Cuando el experimento de inducción de la conidiación se llevó a cabo a 37°C (Fig. 21), la acumulación del ARNm *cat-2* ocurrió antes y fue evidente incluso después de 30 min de exponer al aire el micelio. En estas condiciones, la actividad de la enzima apareció después de 4 h de la exposición al aire. Nuevamente, la inducción de la enzima fue dependiente del proceso de conidiación ya que no se observó acumulación de la enzima ni del ARNm *cat-2* en el micelio control no expuesto al aire. Así, el cambio de temperatura a 37°C *per se* no es suficiente para inducir a la enzima (Fig. 21, carriles 1-4).

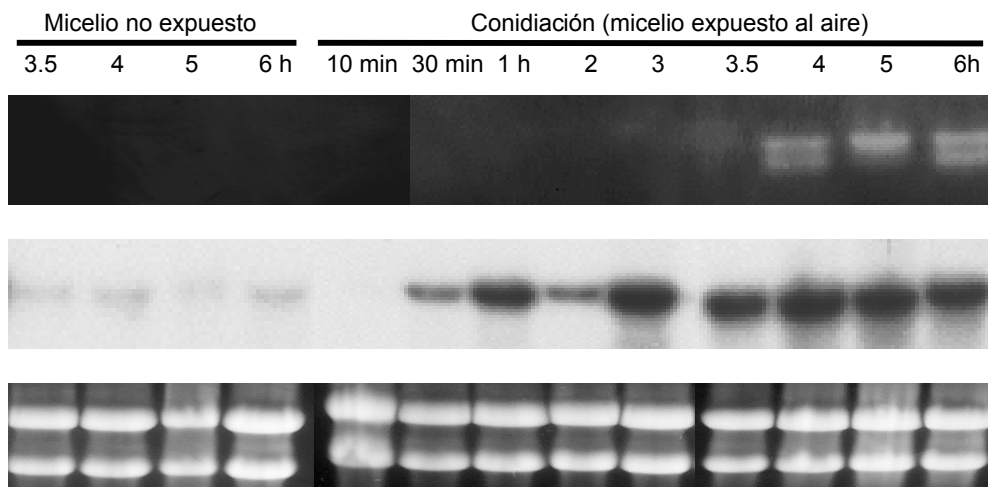


Figura 21. Regulación de la CAT-2 durante la conidiación a 37°C. Micelio en crecimiento exponencial fue filtrado y expuesto al aire para inducir el proceso de conidiación a 37°C. Zimograma de actividad de catalasa (1200 µg de proteína por carril) (panel superior), hibridaciones de tipo *Northern* (panel central) y ARNr (control de cargado, panel inferior). El micelio control consistió en micelio no expuesto al aire (carriles 1 - 4).

La regulación de la expresión de la CAT-2 durante el desarrollo sexual

Para estudiar la regulación de la CAT-2 durante el desarrollo sexual, se inocularon cajas de cultivo con medio SC y después de 6 días de crecimiento se fertilizaron con conidios de una cepa del sexo opuesto. Se colectaron los cuerpos fructíferos a diferentes tiempos, así como muestras de micelio vegetativo (18 h) y de conidios. Se obtuvieron las proteínas totales, se obtuvo la CAT-2 con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y su actividad se analizó en zimogramas de catalasa. La CAT-2 estuvo presente tanto en los peritecios jóvenes (de 2 días post-fertilización) como en los peritecios maduros (10 días post-fertilización) en niveles comparables con los de los conidios (Fig. 22 B).

Asimismo, se observó que ambas catalasas monofuncionales grandes (CAT-1 y CAT-3) estuvieron presentes en los peritecios maduros y que la CAT-1 es la principal actividad de catalasa de los peritecios jóvenes (Fig. 22 B). Ya que la CAT-2 se regula durante el ciclo sexual del hongo, evaluamos la regulación de la CAT-2 durante el crecimiento (Fig. 22 C) y el desarrollo asexual (no se muestra) en las cepas de los dos sexos (A y a), así como en mutantes de los genes que controlan la reproducción sexual (*mat A-1*, *A-2*, *A-3* y *mat a-1*). No se encontró diferencia alguna en la regulación de la CAT-2 entre las cepas de los dos sexos, ni en las cepas mutantes de los genes *mat* (Fig. 22 C).

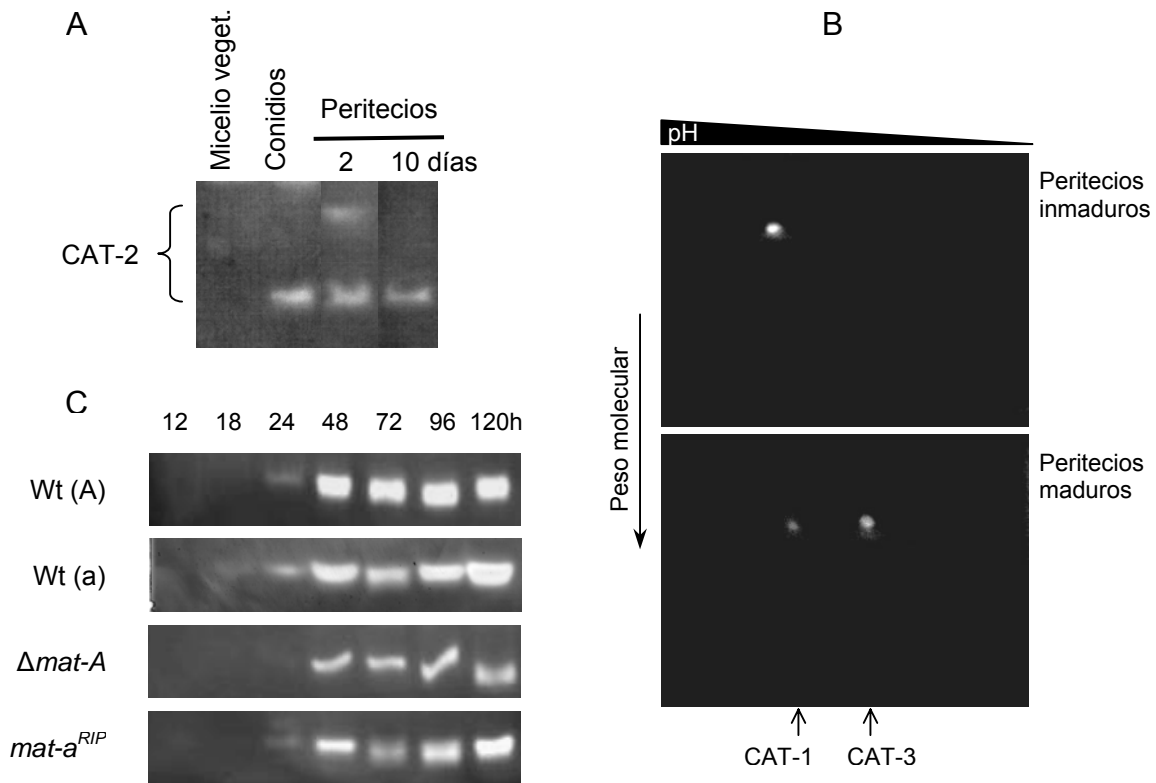


Figura 22. Regulación de la CAT-2 durante el desarrollo sexual. Micelio de 6 días fue fertilizado y después se colectaron los peritecios inmaduros (después de 2 días) y maduros (después de 10 días). Se obtuvieron las proteínas totales de los peritecios, así como de conidios y de micelio vegetativo de 18 h. (A) Zimograma de catalasa en un gel después de obtener la CAT-2 (a partir de 300 μ g de proteína total) con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. (B) Zimograma de catalasa en un gel después de una electroforesis de dos dimensiones con proteínas (50 μ g por gel) de peritecios inmaduros (panel superior) y maduros (panel inferior). (C) Las cepas silvestres de ambos sexos y las cepas mutantes en los genes *mat* se crecieron en medio MV/sacarosa-líquido y la actividad de la CAT-2 se analizó en diferentes tiempos mediante zimogramas de catalasa (600 μ g de proteína por carril).

LA FISIOLOGÍA DE *N. crassa* EN AUSENCIA DE LA CAT-2

La generación de las cepas carentes de CAT-2

Para obtener las cepas mutantes del hongo carentes de CAT-2, se empleó el sistema de silenciamiento de genes de *N. crassa* conocido como RIP (del inglés *Repeat-induced point mutation*). En este proceso las secuencias del ADN que se encuentran duplicadas en el genoma del hongo son mutadas durante la reproducción sexual debido a la generación de transiciones G → A o C → T. Las mutaciones más frecuentes ocurren en las citosinas de los dinucleótidos CpA y se ha observado además que las citosinas que no son mutadas pueden ser metiladas. Como consecuencia de este proceso se generan muchas mutaciones que introducen codones de terminación o alteran la especificación de los aminoácidos; de manera que el RIP es un sistema irreversible de silenciamiento de genes (Selker, 1997).

El plásmido pCP2 circular fue usado para transformar la cepa *his-3*⁻ (FGSC 6103) y dirigir la integración ectópica de una copia del ADNc *cat-2* al cromosoma I de manera adyacente al locus *his-3*. El evento de integración esperado se muestra en la figura 23 A. Las transformantes protótrofos de histidina fueron recuperadas y analizadas por hibridación de tipo *Southern*. La cepa de *N. crassa pcp2-15* mostró el patrón esperado que consistió en 2 copias del gen *cat-2* que fueron evidentes después de hibridar el ADN digerido con *EcoRI* o *SalI* con la sonda *cat-2*. Una de ellas correspondiente al gen *cat-2* silvestre (fragmento mayor de 9 kb) y la segunda a la integración ectópica (fragmento *EcoRI* de 2.4 kb ó *SalI* de ≈8 kb) (Fig. 23 B y C). Asimismo, debido a que esperábamos la integración del plásmido pCP2 completo, podíamos esperar también dos copias del gen *his-3*. En concordancia, la hibridación del ADN digerido con ambas enzimas con la sonda *his-3* mostró ambas copias del gen, la copia silvestre y la copia proveniente del plásmido pCP2 (un fragmento *SalI* de ≈1.5 kb ó *EcoRI* de ≈8 kb) (Fig. 23 D y E). Debido a que la transformación con el plásmido pCP2 se llevó a cabo con conidios, que son células multinucleadas, para asegurar el estado homocarionte de la cepa *pcp2-15* se realizaron 3 resiembras a partir de una colonia aislada, después de las cuales se analizó su ADN nuevamente con una hibridación de tipo *Southern* con las enzimas *EcoRI*, *SalI* y *SspI* (Fig. 23 F). La cepa *pcp2-15* fue cruzada por una cepa silvestre y de su descendencia se seleccionaron las cepas protótrofos de histidina (cepas *cat-2*^{RIP}). Se analizó la actividad de catalasa de la CAT-2 mediante zimogramas de actividad y se observó que de las 78 cepas recuperadas el 28% perdió la actividad de CAT-2. En la figura 24 A se muestra un zimograma representativo.

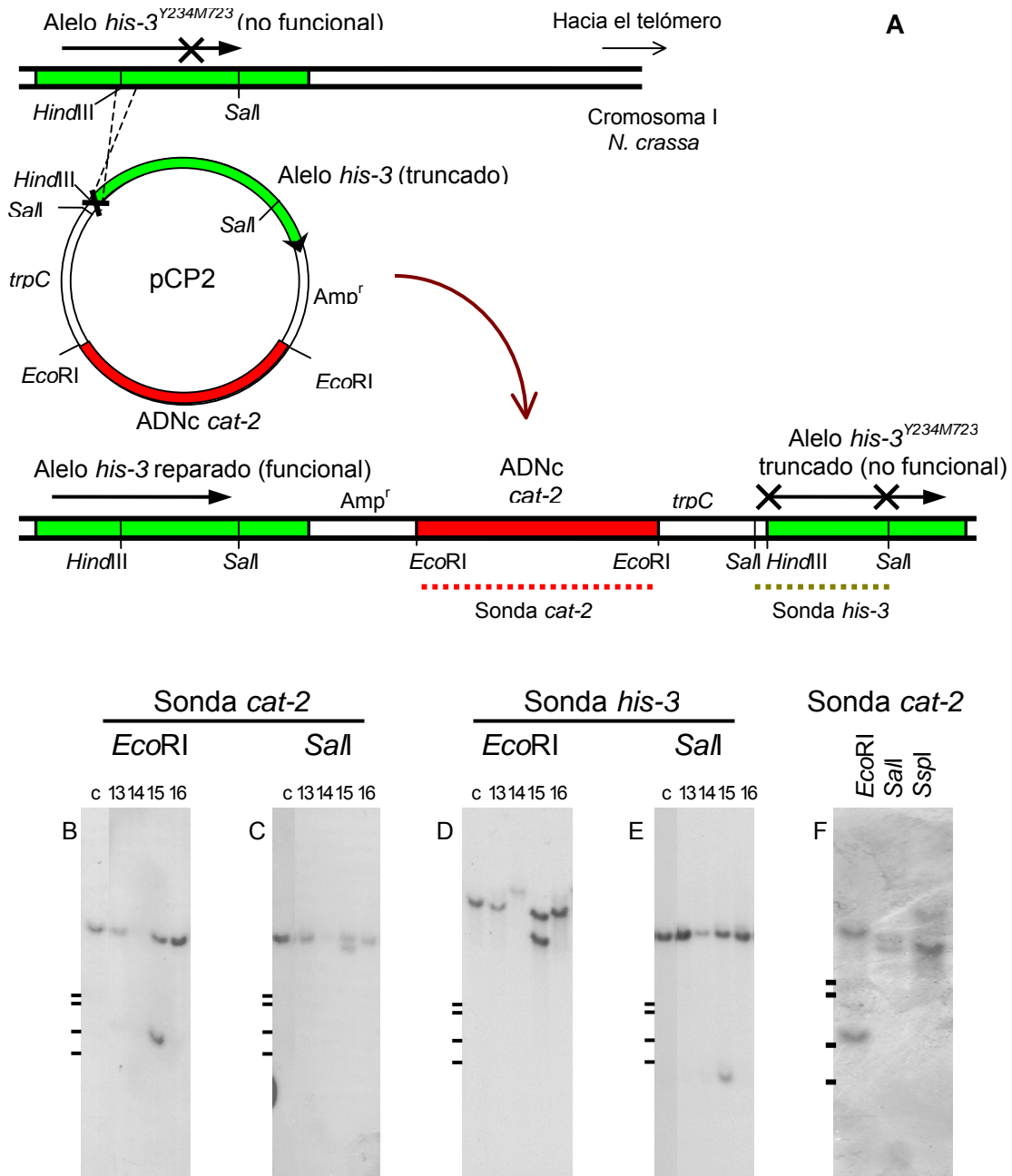


Figura 23. Integración ectópica de un fragmento del gen *cat-2* en el cromosoma-I de *N. crassa*. La cepa *his-3*⁻ (6103) fue transformada con el plásmido pCP-2 circular. (A) Esquema del evento de integración esperado y de las sondas utilizadas. (B-E) hibridación tipo *Southern* del ADN de las cepas transformadas (cepas *pcp2-13* a *16*) y de la cepa 6103 (carril c). (B) ADN digerido con *EcoRI* e hibridado con la sonda del gen *cat-2*, (C) digerido con *SalI* e hibridado con la sonda del gen *cat-2*, (D) digerido con *EcoRI* e hibridado con la sonda del gen *his-3* y (E) digerido con *SalI* e hibridado con la sonda del gen *his-3*. (F) La cepa que mostró el patrón esperado *pcp2-15* se recuperó en estado homocariote y su ADN se digirió con las enzimas *EcoRI*, *SalI* y *SspI* y se hibridó con la sonda *cat-2*. Los marcadores de peso molecular se muestran en orden descendente 4,000, 3,000, 2,000 y 1,650 pb (B-F, líneas de la izquierda).

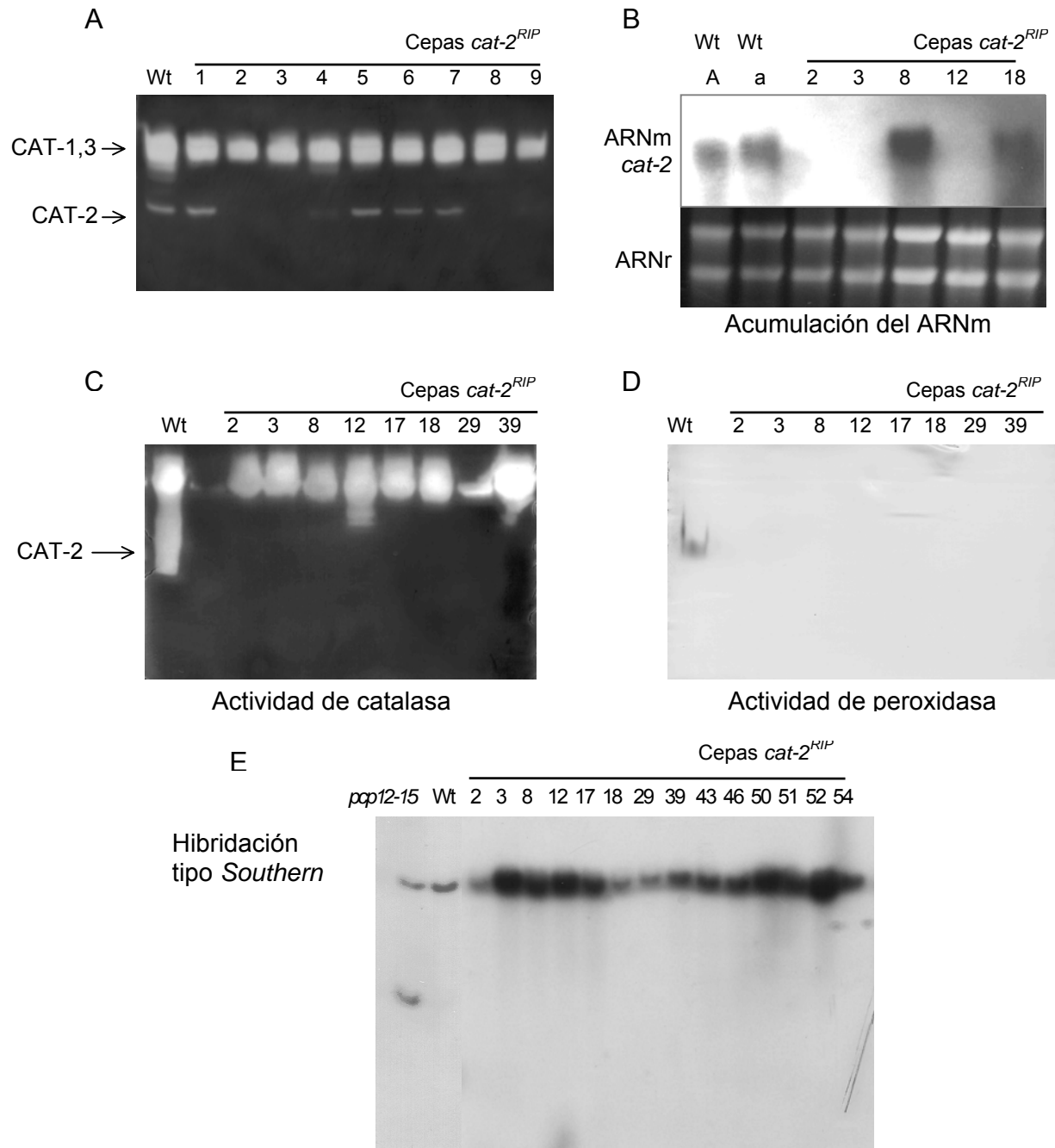


Figura 24. Caracterización de las cepas mutantes *cat-2^{RIP}*. (A) La cepa *pcp2-15* fue cruzada con una cepa silvestre (Wt) y se analizó la actividad de la CAT-2 de la descendencia mediante un zimograma de catalasa. Las cepas sin actividad de catalasa se hicieron crecer en metanol y se analizó la acumulación del ARNm *cat-2* y las actividades de la CAT-2. (B) Hibridación de tipo *Northern*. (C) Zimograma de catalasa. (D) Zimograma de peroxidasa (con dianisidina y H₂O₂). (E) El ADN de las cepas *cat-2^{RIP}* digerido con *EcoRI* fue analizado con una hibridación de tipo *Southern* con la sonda *cat-2*. Se compara el patrón de hibridación con el de una cepa silvestre (Wt) y la transformante *pcp2-15*.

Se seleccionaron 8 de las cepas que perdieron por completo la actividad de catalasa de la CAT-2 y se caracterizaron con más detalle. Se evaluó la ausencia de la actividad de la CAT-2 en las diferentes condiciones en las que se induce la enzima, tales como la conidiación, el crecimiento estacionario y en metanol (Fig. 24 C, se muestra la actividad de catalasa de las cepas que crecieron en metanol). En todas las condiciones evaluadas las cepas carecieron por completo de la actividad de la CAT-2. Asimismo se evaluó la actividad de peroxidasa de estas cepas en zimogramas de actividad con *o*-dianisidina y se observó que todas ellas perdieron también la actividad de peroxidasa (Fig. 24 D). También intentamos evaluar la presencia de la proteína CAT-2 mediante inmunodetecciones de tipo *Western*; sin embargo, esto no fue posible debido a la poca especificidad de nuestros anticuerpos.

Evaluamos la acumulación del transcrito *cat-2* por hibridaciones de tipo *Northern*. La mayoría de las cepas mutantes no acumuló el ARNm del gen *cat-2*. Así, en estas cepas, la falta de actividad de CAT-2 se debe a la ausencia del transcrito y de la proteína (Fig. 24 B, muestra la acumulación del transcrito en 5 cepas).

Por otra parte, nos aseguramos de que después de la cruza sólo la secuencia cromosomal mutada del gen *cat-2* estuviese presente en las cepas *cat-2*^{RIP}. Para ello, determinamos la presencia de la integración ectópica de *cat-2* junto al locus *his-3* mediante una hibridación de tipo *Southern*. El ADN de las cepas *cat-2*^{RIP} fue digerido con *EcoRI* e hibridado con la sonda *cat-2* (Fig. 24 E). En ninguna de las cepas analizadas se encontró la secuencia ectópica del gen *cat-2*, lo que sugirió que todas ellas son silvestres para el locus *his-3*.

También se determinó el patrón de segregación de la CAT-2 en cruza sexuales. Así, se seleccionaron al azar cuatro de las cepas caracterizadas (*cat-2*^{RIP2}, *RIP8*, *RIP12* y *RIP39*) y se cruzaron con la cepa silvestre. Se observó que entre el 40 y el 55% (42, 40, 50 y 55% respectivamente) de la descendencia careció de la actividad de la CAT-2, lo que sugirió una segregación 1:1 para todas ellas (en la Fig. 25 se muestra un gel representativo).

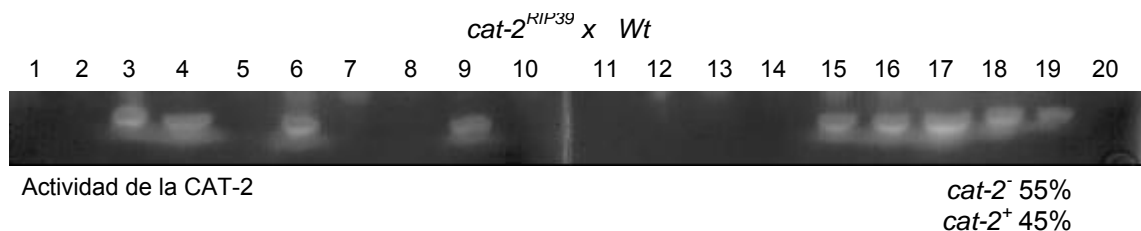


Figura 25. Segregación del fenotipo CAT-2⁻ de una cepa mutante *cat-2*^{RIP}. La cepa *cat-2*^{RIP39} fue cruzada con una cepa silvestre y de su descendencia se recuperaron al azar 20 colonias. Éstas fueron crecidas hasta la etapa estacionaria del crecimiento y la actividad de la CAT-2 se analizó en zimogramas de catalasa.

Finalmente, seleccionamos tres de las cepas que carecieron del ARNm *cat-2* (*cat-2*^{RIP2}, *RIP3*, *RIP12*), clonamos el gen *cat-2* y secuenciamos una porción de su extremo 5' (Fig. 26 A).

Como esperábamos, en las tres secuencias determinadas se encontraron numerosas mutaciones características del proceso de RIP, siendo algunas de ellas específicas de una cepa mientras que otras estuvieron presentes en las tres secuencias. Todas las mutaciones observadas fueron transiciones y la mayor parte de ellas resultó en mutaciones de terminación o de aminoácido (Fig. 26 B). La primera mutación de terminación resultó de una transición (G→A) en el codón de un triptofano (Trp 118) que resultó en un codón de terminación (TGG→TAG) y estuvo presente en las tres secuencias determinadas. Nuestros resultados demuestran que la ausencia de la actividad CAT-2 se debe a las mutaciones generadas en su gen durante el proceso de RIP e indican la ausencia de la proteína CAT-2 en las cepas *cat-2*^{RIP2}, *RIP3* y *RIP12*. La falta del ARNm *cat-2* en estas cepas se puede explicar por la inducción del proceso de degradación del ARNm debida a la mutación de terminación (NMD por sus siglas en inglés, *Nonsense-mediated mRNA decay*) por la presencia de un codón de terminación prematuro (González *et al.*, 2001).

La caracterización de las cepas carentes de CAT-2

Para estudiar la fisiología de las cepas mutantes sin CAT-2, seleccionamos al azar cepas de ambos sexos de la progenie (F2 y F3) de las mutantes *cat-2*^{RIP2} y *cat-2*^{RIP12}. Se encontró que el fenotipo de estas cepas tenía diferencias importantes con respecto a la cepa silvestre relacionadas con el desarrollo sexual y la tolerancia al estrés. Sin embargo, demostramos que este fenotipo no fue consecuencia de la mutación del gen *cat-2*. En adelante, a estas cepas se les denominará *cat-2*^{RIP(F2)} y la descripción de su fenotipo se muestra en el apéndice 3. Fuimos capaces de obtener, mediante cruza sexual, algunas cepas de *N. crassa* mutantes para el gen *cat-2* (*cat-2*^{RIP}) pero que no presentaron el fenotipo anteriormente mencionado, que fue debido, presumiblemente, a otra mutación. Analizamos la progenie (F5) de una de estas cepas (derivada de la cepa *cat-2*^{RIP12}) y observamos que todas ellas fueron silvestres con respecto a este fenotipo. De esta progenie seleccionamos cepas de ambos sexos (*cat-2*^{RIP12-7}, A y *cat-2*^{RIP12-8}, a) y éstas se caracterizaron nuevamente, haciendo particular énfasis en las diferencias encontradas con anterioridad.

A	<i>cat-2</i>	ATGTCGAGTGCCCGTCGCAAGTCCAACGTGGCGGTGGTGGCACCAGGAACCACGACTGGTGGCCCGCCAGCTTAG	80
	<i>cat-2^{RIP2}</i>	ATGTCGAGTGCCCGTCGCAAGTCCAACGTGGCGGTGGTGGCACCAGGAACCACGACTGGTGGCCCGCCAGCTTAG	80
	<i>cat-2^{RIP3}</i>	ATGTCGAGTGCCCGTCGCAAGTCCAACGTGGCGGTGGTGGCACCAGGAACCACGACTGGTGGCCCGCCAGCTTAG	80
	<i>cat-2^{RIP12}</i>	ATGTACGAGCGCCCGNACGCAAGTCCAACGTGGCGGTGGTGGCACCAGGAACCACGACTGGTGGCCCGCCAGCTTAG	80
	<i>cat-2</i>	GCTCAACATCCTCCGCCAACATACCCCGTCTCCAACCCCTCGACAAAGACTTCGACTATGCCGTGCCTTCAAGAGCC	160
	<i>cat-2^{RIP2}</i>	GCTCAACATCCTCCGCCAACATACCCCGTCTCCAACCCCTCGACAAAGACTTCGACTATGCCGTGCCTTCAAGAGCC	160
	<i>cat-2^{RIP3}</i>	GCTCAACATCCTCCGCCAACATACCCCGTCTCCAACCCCTCGACAAAGACTTCGACTATGCCGTGCCTTCAAGAGCC	160
	<i>cat-2^{RIP12}</i>	GCTCAACATCCTCCGCCAACATACCCCGTCTCCAACCCCTCGACAAAGACTTCGACTATGCCGTGCCTTCAAGAGCC	160
	<i>cat-2</i>	TCGACTACGAAGGCCTCAAGAAGGACCTCACTAAACTCATGACCGACTCGCAAGACTGGTGGCCTGCTGATTCGGCCAC	240
	<i>cat-2^{RIP2}</i>	TCGACTACGAAGGCCTCAAGAAGGACCTCACTAAACTCATGACCGACTCGCAAGACTGGTGGCCTGCTGATTCGGCCAC	240
	<i>cat-2^{RIP3}</i>	TCGACTACGAAGGCCTCAAGAAGGACCTCACTAAACTCATGACCGACTCGCAAGACTGGTGGCCTGCTGATTCGGCCAC	240
	<i>cat-2^{RIP12}</i>	TCGACTACGAAGGCCTCAAGAAGGACCTCACTAAACTCATGACCGACTCGCAAGACTGGTGGCCTGCTGATTCGGCCAC	240
	<i>cat-2</i>	TATGGCGGTCTCTTCATCCGTCATGGCATGGCACAGCGCCGGCACCTACCGTGCACGGATGGCCGTGAGGCGGTGGTGA	320
	<i>cat-2^{RIP2}</i>	TATGGCGGTCTCTTCATCCGTCATGGCATGGCACAGCGCCGGCACCTACCGTGCACGGATGGCCGTGAGGCGGTGGTGA	320
	<i>cat-2^{RIP3}</i>	TATGGCGGTCTCTTCATCCGTCATGGCATGGCACAGCGCCGGCACCTACCGTGCACGGATGGCCGTGAGGCGGTGGTGA	320
	<i>cat-2^{RIP12}</i>	TATGGCGGTCTCTTCATCCGTCATGGCATGGCACAGCGCCGGCACCTACCGTGCACGGATGGCCGTGAGGCGGTGGTGA	320
	<i>cat-2</i>	GGGTCAGCAGCGTTTTGCTCCTCTCAAAGCTGGCCGACAACGCTCTCTCGACAAGGCCCGTCTCTCTGAGCCCA	400
	<i>cat-2^{RIP2}</i>	GGGTCAGCAGCATTTTTGCTCCTCTCAAAGCTGGCCGACAACGCTCTCTCTAAAGGCCCGTCTCTCTAGCCCA	400
<i>cat-2^{RIP3}</i>	GGGTCAGCAACGTTTTACTCCTCTCAAAGCTGGCCGACAACGCTCTCTCTAAAGGCCCGTCTCTCTAGCCCA	400	
<i>cat-2^{RIP12}</i>	GGGTCAGCAGCATTTTTGCTCCTCTCAAAGCTGGCCGACAACGCTCTCTCTAAAGGCCCGTCTCTCTAGCCCA	400	
<i>cat-2</i>	TCAAACAAAAGTACGGCAAAGATCTCGTGGTCCGACCTGCTCCTTCTAACCGGTAACGTTGCGCTCGAGTCCATGGGC	480	
<i>cat-2^{RIP2}</i>	TCAAACAAAAGTACGGCAAAGATCTCGTGGTCCGACCTGCTCCTTCTAACCGGTAACGTTGCGCTCGAGTCCATAGGC	480	
<i>cat-2^{RIP3}</i>	TCAAACAAAAGTACGGCAAAGATCTCGTGGTCCGACCTGCTCCTTCTAACCGGTAACGTTGCGCTCGAGTCCATAGGC	480	
<i>cat-2^{RIP12}</i>	TCAAACAAAAGTACGGCAAAGATCTCGTGGTCCGACCTGCTCCTTCTAACCGGTAACGTTGCGCTCGAGTCCATAGGC	480	
<i>cat-2</i>	TTCAAGACCTTTGGCTTTGCCGGTGCCGTCGCCACACCTGGGAGGCTGACGAGTCTGTATACTGGGGTGTGAGACCAC	560	
<i>cat-2^{RIP2}</i>	TTTAAGACCTTTGGCTTTACCGGTAGCCGTCCTGATACTTAGGAGGTTGACGAGTTTGTGATTTAGGGTATGAAACTAT	560	
<i>cat-2^{RIP3}</i>	TTCAAGACCTTTGGCTTTGCCGGTAGCCGTCGCCACACCTAGGAGGCTAACAAAGTCTATATACTGGGGTGTGAGACTAC	560	
<i>cat-2^{RIP12}</i>	TTTAAGACCTTTGGCTTTACCGGTAGCCGTCCTGATACTTAGGAGGTTGACGAGTTTGTGATTTAGGGTATGAAACTAT	560	
<i>cat-2</i>	ATGGTTGGGTAAACGAGGACCGTTACTCCGAGGGTCAGGAAGGCCACGAAGGACATGGTGTGCGTCCAAAGGTGACGAGTCCA	640	
<i>cat-2^{RIP2}</i>	ATGGTTGGGTAAACGAGGACCGTTACTCCGAGGGTAGGAAGGCTACGAAGGATATAGTATATTTAAGGTGACGAGTTTA	640	
<i>cat-2^{RIP3}</i>	ATGGTTGGGTAAACGAGGACCGTTACTCCGAGGGTAGGAAGGCTACGAAGGATATAGTGTGCGTCCAAAGTAAACAGTCCA	640	
<i>cat-2^{RIP12}</i>	ATGGTTGGGTAAACGAGGACCGTTACTCCGAGGGTAGGAAGGCTACGAAGGATATAGTATATTTAAGGTGACGAGTTTA	640	
<i>cat-2</i>	AGAAACAGCACACGGACATCCACAACC-GTGATCTGCAAAGCCCTTGCCCTCCTCCATATGGGCCTTATCTACGTTAA	719	
<i>cat-2^{RIP2}</i>	AGAAATAGTATACGGATATTTATAACC-GTAATTTGTTAAAGCCCTTTACCTCCTCCATATAGGCCTTATTTACGTTAA	719	
<i>cat-2^{RIP3}</i>	AGAAATAGCATACGGACATCCACAACC-GTAATCTATAAAGCCCTTGCCCTCCTCCATATAGGCCTTATCTACGTTAA	719	
<i>cat-2^{RIP12}</i>	AGAAATAGTATACGGATATTTATAACC-GTAATTTGTTAAAGCCCTTTACCTCCTCCATATAGGCCTTATTTACGTTAA	720	
B	<i>cat-2</i>	MSECPVRKSNVGGGTRNHDWWPAQLRNLILRQHTPVSNPLDKDFDYAAAFKSLDYEGLKKDLTKLMTDSQDWWPADFGH	80
	<i>cat-2^{RIP2}</i>	MSECPVRKSNVGGGTRNHDWWPAQLRNLILRQHTPVSNPLDKDFDYAAAFKSLDYEGLKKDLTKLMTDSQDWWPADFGH	80
	<i>cat-2^{RIP3}</i>	MSECPVRKSNVGGGTRNHDWWPAQLRNLILRQHTPVSNPLDKDFDYAAAFKSLDYEGLKKDLTKLMTDSQDWWPADFGH	80
	<i>cat-2^{RIP12}</i>	MYERPVRKSNVGGGTRNHDWWPAQLRNLILRQHTPVSNPLDKDFDYAAAFKSLDYEGLKKDLTKLMTDSQDWWPADFGH	80
	<i>cat-2</i>	YGGLFIRMAWHSAGTYRVTGRRGGGEGQQRFFAPLNS*PDNVSLDKARRLL*PIKQKYSNKIS*SDLLLLLTSNVTLFESIG	160
	<i>cat-2^{RIP2}</i>	YGGLFIRMAWHSAGTYRITDGRGGGEGQQRFFAPLNS*PDNVSLDKARRLL*PIKQKYSNKIS*SDLLLLLTSNVTLFESIG	160
	<i>cat-2^{RIP3}</i>	YGGLFIRMAWHSAGTYRVTGRRGGGEGQQRFFAPLNS*PDNVSLDKARRLL*PIKQKYSNKIS*SDLLLLLTSNVTLFESIG	160
	<i>cat-2^{RIP12}</i>	YGGLFIRMAWHSAGTYRITDGRGGGEGQQRFFAPLNS*PDNVSLDKARRLL*PIKQKYSNKIS*SDLLLLLTSNVTLFESIG	160
	<i>cat-2</i>	FKTFGFAGGRPDTWEADESVYWGAEITWLGNEEDRYSEGEGHEGHCVVQGDSEKQHTDIHNRDLOSPLASSHMLIYVN	240
	<i>cat-2^{RIP2}</i>	FKTFGFTGSRLDI*EVDEFVY*GIETIWLGNEDRYSEG*EGYEGYSII*GDEFKK*YTDIYNRNL*SPFTSSYIGLIYVN	240
	<i>cat-2^{RIP3}</i>	FKTFGFAGSRPNT*EANKSIIYWGAEITWLGNEEDRYSEG*EGYEGYSVVQSNKSKK*HTDIHNRNL*SPASSYIGFIYVN	240
	<i>cat-2^{RIP12}</i>	FKTFGFTGSRLDI*EVDEFVY*GIETIWLGNEDRYSEG*EGYEGYSII*GDEFKK*YTDIYNP*FVKPLYLILLYRYPYLR*	240

Figura 26. Secuenciación del gen *cat-2* de cepas mutantes *cat-2^{RIP}*. (A) El gen *cat-2* de las cepas *cat-2^{RIP2, 3, 12}* fue amplificado por PCR, clonado y la secuencia de nucleótidos de una porción de su extremo 5' fue determinada (sólo se muestran los primeros 720 pb). (B) Secuencia de aminoácidos predecible de dichos genes (sólo se muestran los primeros 240 aminoácidos). Se indican los codones de terminación (*) y las posiciones idénticas en las 4 secuencias (amarillo).

El crecimiento de las cepas *cat-2*^{RIP}

Se evaluó el crecimiento de las cepas *cat-2*^{RIP} en medio MV líquido y sólido con distintas concentraciones de sacarosa o glucosa (0.05-1.5%) como fuente de carbono. Asimismo, se evaluó el crecimiento de estas cepas en los sustratos en que se observó una fuerte inducción de la CAT-2, tales como el ácido oléico (1 – 6 mM), el ácido úrico (10 – 20 mM), el metanol (2 - 4%), el acetato (20 – 40 mM), el etanol (2 - 4%) y el glicerol (2-3%), así como en medios en los que se reemplazó la fuente de nitrógeno (NH₄NO₃) por KNO₃ (10 mM) o por ácido úrico (5 mM) (con glucosa, sacarosa o ácido oléico como fuente de carbono). En ninguna de las condiciones evaluadas se encontró diferencia significativa entre el crecimiento de las cepas, ni se encontraron diferencias con respecto a la morfología de las hifas, ni a los patrones de ramificación del micelio (Fig. 28, sólo se muestra la morfología de la cepa *cat-2*^{RIP} durante el crecimiento estacionario).

Las cepas *cat-2*^{RIP} y el estrés

Debido a la dualidad funcional de la CAT-2, estudiamos la sensibilidad de las cepas *cat-2*^{RIP} ante el H₂O₂ y ante un peróxido orgánico, el *tert*-butil hidroperóxido (butilperóxido). Evaluamos la supervivencia de las esporas (conidios) y de las células en crecimiento (conidios germinados durante 5 horas) ante diferentes concentraciones de los hidroperóxidos (durante 30 y 60 minutos) y observamos que la sensibilidad de la cepa mutante sin CAT-2 fue la misma que la de la cepa silvestre en todos los casos (Tabla 5). Por otra parte, se ha demostrado que las catalasa-peroxidasas también poseen actividad de peroxinitritasa (Wengenack *et al.*, 1999) por lo que son capaces de contender con especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Un sistema que se ha empleado comúnmente para generar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno consiste en provocar la protonación del nitrito en pH ácido. Esto genera HNO₂ que es capaz de dismutar y reaccionar con el O₂ y el O₂⁻ para formar especies como el NO[·], NO₂[·], NO₃, N₂O₃, N₂O₄ y el ONOO⁻ (ONOOH). Así, evaluamos el crecimiento de la cepa *cat-2*^{RIP} en cajas de medio MV/sacarosa con NaNO₂ (5 –10 mM) con pH ácido (pH 5.0 y 5.5) y pH 7.0 (control). La sensibilidad de las cepas mutantes sin CAT-2 ante estos tratamientos fue la misma que la de la cepa silvestre (no se muestra).

El crecimiento de las cepas *cat-2*^{RIP} en medio MV/sacarosa-agar (1.5%) no se vio afectado, con respecto al de las cepas silvestres, por la temperatura en un intervalo de 30 - 42°C. Tampoco se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de las cepas en este intervalo de temperatura cuando la fuente de carbono se reemplazó por glucosa (0.05-1.5%),

ácido oléico (6 mM) o metanol (4%), ni cuando se empleó nitrato (KNO₃, 10 mM) o ácido úrico (5 mM) como única fuente de nitrógeno (no se muestra).

También se evaluó el efecto de un choque térmico (de 30 ó 60 minutos) en la viabilidad de los conidios y de las células del hongo en crecimiento. Los conidios de ambas cepas fueron sometidos a un choque de calor de 50°C, o fueron germinados durante 5 horas y después incubados a una temperatura letal (48°C). Se determinó el porcentaje de supervivencia en función de los experimentos control mantenidos a 30°C. No se observaron diferencias significativas en la viabilidad de las dos cepas (Tabla 5).

Finalmente, evaluamos la sensibilidad de la cepa mutante ante las condiciones de estrés osmótico generadas con concentraciones elevadas de NaCl o sorbitol (1 - 1.2 M). Tampoco se encontraron diferencias ante estos tratamientos (no se muestra).

Tabla 5. Efecto de los hidroperóxidos y del choque de calor en la supervivencia de las cepas *cat-2^{RIP}* y silvestre de *N. crassa*

Tratamiento	Tiempo (min)	Células ¹	% Sobrevida ²	
			Wt	<i>cat-2^{RIP}</i>
t-BOOH, 0.5 mM	30	CG	93	100
t-BOOH, 1.0 mM	30	CG	77	71
t-BOOH, 1.0 mM	60	CG	67	70
H ₂ O ₂ , 1.0 mM	30	CG	100	100
H ₂ O ₂ , 10 mM	30	CG	71	70
H ₂ O ₂ , 10 mM	60	CG	60	62
48°C	30	CG	56	65
48°C	60	CG	10	15
t-BOOH, 2.0 mM	30	C	12	11
t-BOOH, 2.0 mM	60	C	5	3
H ₂ O ₂ , 20 mM	30	C	100	100
H ₂ O ₂ , 20 mM	60	C	100	94
50°C	30	C	26	17
50°C	60	C	12	12

¹ CG, conidios germinados; C, conidios.

² Con respecto a las células control mantenidas a 30°C o sin peróxidos. En todos los casos la desviación estándar fue menor o cercana al 15%.

La conidiación de las cepas *cat-2*^{RIP}

Estudiamos con detalle el proceso de conidiación de las cepas *cat-2*^{RIP}. Para ello, se evaluó la formación del micelio aéreo y de los conidios en las cepas mutantes y silvestres de ambos sexos (A y a) mediante diferentes estrategias. En primera instancia, se evaluó la conidiación inducida a partir de un micelio en diferentes etapas del crecimiento. Se filtró el micelio de la etapa del crecimiento exponencial (16 h), estacionario (3 días) o estacionario tardío (4-5 días) y se expuso al aire. Se determinó la masa del micelio aéreo y el número de conidios formados por ambas cepas después de 24 horas. No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las condiciones evaluadas (Fig. 27 A y B, sólo se muestra la inducción de la conidiación del micelio en crecimiento exponencial).

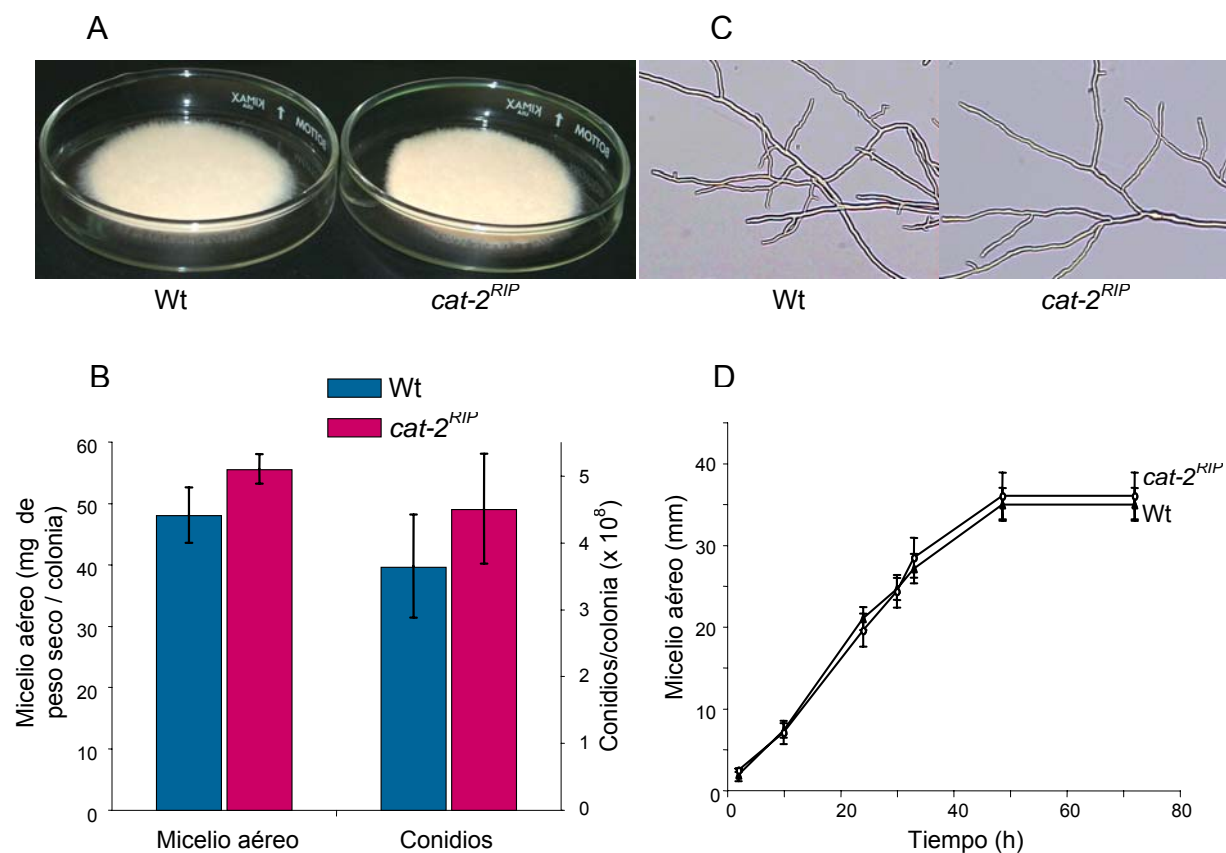


Figura 27. La formación de macroconidios en la cepa *cat-2*^{RIP}. Micelio del crecimiento exponencial de las cepas *cat-2*^{RIP} y silvestre fue filtrado y expuesto al aire y después de 24 h se determinó la biomasa aérea y el número de conidios formados. Por otra parte, se colocó un portaobjetos en el micelio de un cultivo estático y se determinó la longitud del micelio aéreo y la morfología de las hifas aéreas. (A) Micelio expuesto al aire por 24 h. (B) Peso seco del micelio aéreo y número de conidios producidos después de 24 h. (C) Ramificaciones del micelio aéreo. D) Longitud del micelio aéreo.

También se evaluó el desarrollo de los conidióforos en la interfase (aire-líquido) de cultivos estáticos. Tampoco se observaron diferencias en la morfología de las hifas aéreas o en su patrón de ramificación (Fig. 27 C), ni en su crecimiento (Fig. 27 D) o en el tiempo de la formación de los conidios (no se muestra). A pesar de la regulación que existe de la CAT-2 por la temperatura durante la conidiación, tampoco se observaron diferencias cuando los experimentos se llevaron a cabo a diferentes temperaturas (no se muestra).

La formación de los conidios en *N. crassa* también se puede inducir en cultivos líquidos después de privar de carbono o de nitrógeno al hongo (Muller y Russo, 1989). Este proceso también ocurre en la etapa del crecimiento estacionario, en donde se induce la CAT-2. Durante esta etapa, en el ápice de las hifas es posible observar cadenas conidiales semejantes a los conidióforos aéreos (Fig. 28 A). Asimismo, es posible observar septos que fragmentan el micelio en estructuras semejantes a los artroconidios (Fig. 28 B). Sin embargo, ninguno de estos dos eventos tiene como resultado la formación de esporas libres, sino que las esporas se liberan en cúmulos formados por varias células (Fig. 29 C-D). Estas esporas, además, son de mayor dimensión que los macroconidios que se forman en el aire y presentan muchas vacuolas (Fig. 28 A y B). Debido a estas diferencias y a que el proceso ha sido muy poco estudiado, determinamos si la formación de estas estructuras depende de los genes que regulan la macroconidiación del hongo. Para ello, evaluamos el desarrollo de las cepas mutantes *acon-2*, *acon-3* y *fl* (*fluffy*) en cultivos líquidos. El desarrollo de estas cepas está bloqueado en un evento anterior a la formación de las constricciones menores (*acon-2*) o mayores (*fl* y *acon-3*) de los conidióforos, de manera que nunca se forman macroconidios. Observamos que ninguna de las cepas formó conidios en los cultivos líquidos. Además, en los cultivos de las cepas *acon-3* y *fl* (Fig. 28 C y D) fue posible observar hifas con constricciones menores semejantes a los conidióforos característicos de las fases aéreas de estas cepas. Este resultado sugiere que las estructuras formadas en medio líquido son macroconidios.

La formación de los macroconidios en los cultivos líquidos comenzó al tercer día de crecimiento (Fig. 28 A y B). El número de esporas que formaron las cepas silvestre y la mutante *cat-2^{RIP}* durante este día fue semejante, así como el número de células en el que se fragmentó cada segmento (3.3 - 3.5 células/segmento). Sin embargo, en la etapa tardía del crecimiento estacionario (4-5 días) la cepa *cat-2^{RIP}* formó más conidios que la cepa silvestre (Fig. 29 A, se muestra para las cepas mutantes *cat-2^{RIP}* de ambos sexos). La diferencia en el número de conidios que formaron estas cepas se incrementó al utilizar como fuente de carbono el ácido oléico en presencia de bajas concentraciones de sacarosa (Fig. 29 B-D).

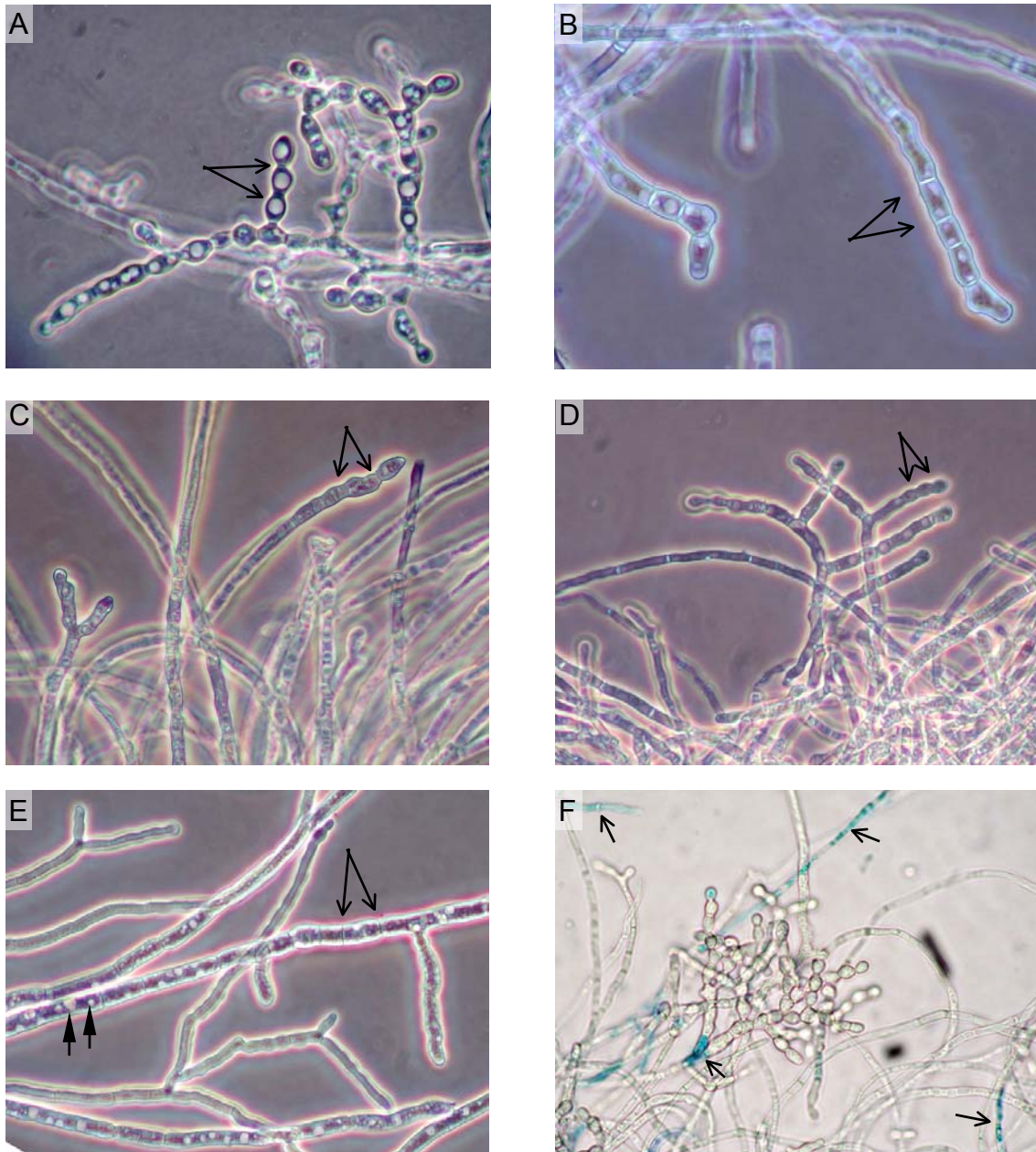


Figura 28. La formación de los conidios en medio líquido durante la etapa del crecimiento estacionario. Cultivos de diferentes cepas en la etapa estacionaria del crecimiento se analizaron bajo el microscopio. (A) Imagen de la formación de los blastoconidios en la cepa *cat-2^{RIP}*. (B) Formación de los arthroconidios en la cepa *cat-2^{RIP}*. (C) Conidióforos con constricciones menores formados por la cepa *fl* y (D) por la cepa *acon-3*. (E) Imagen de la formación de los septos y las vacuolas en las hifas de la cepa *cat-2^{RIP}*. (F) Viabilidad de las hifas de la cepa *cat-2^{RIP}* con azul de tripano. Las flechas muestran las constricciones mayores que delimitan los blastoconidios (A), los septos que delimitan los arthroconidios (B), las constricciones menores en que está bloqueado el desarrollo de las cepas *fl* (C) y *acon-3* (D), los septos y las vacuolas de las hifas (E, punta abierta y cerrada, respectivamente) y las células muertas teñidas con azul de tripano (F). El desarrollo de la cepa *cat-2^{RIP}* fue indistinguible del de la cepa silvestre.

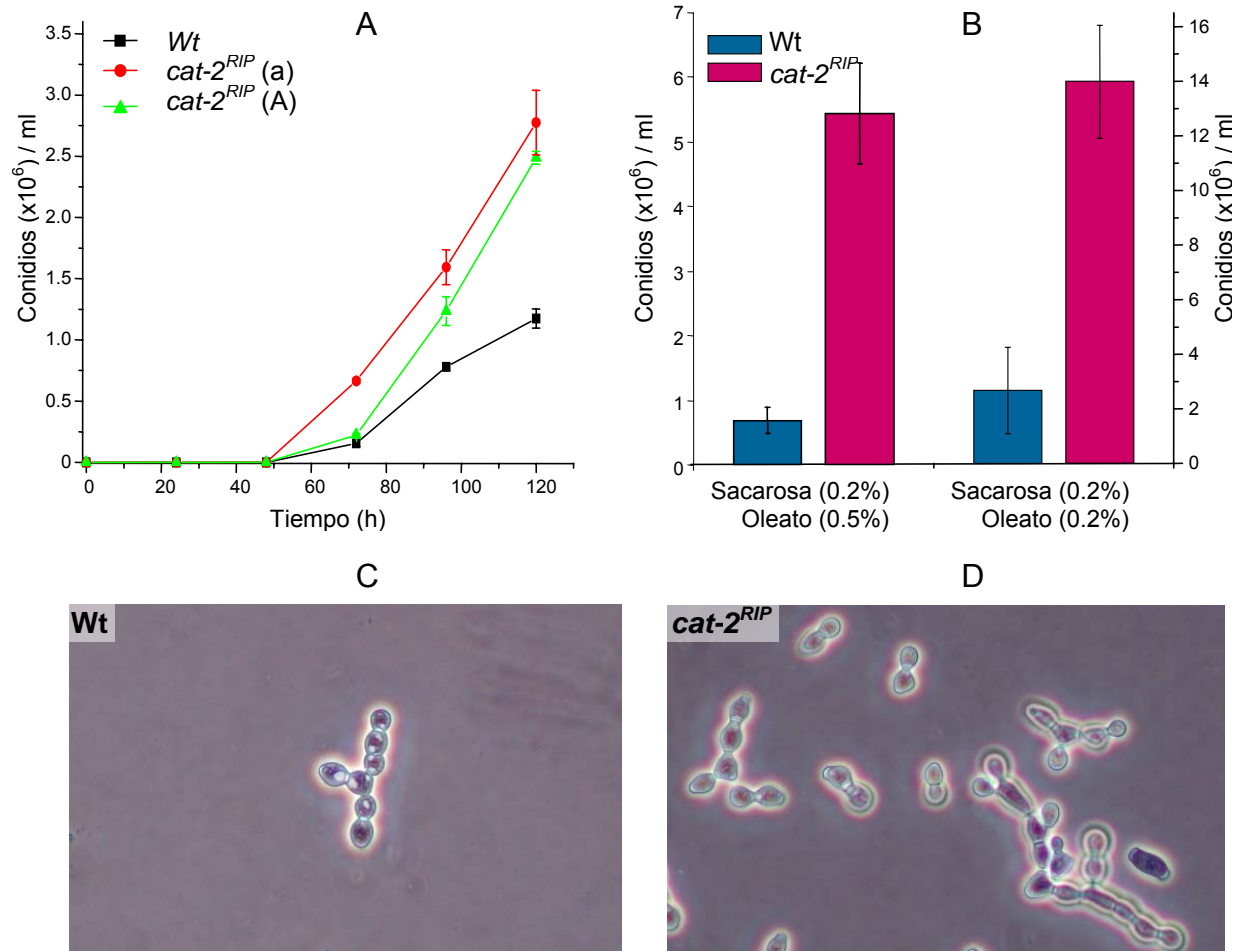


Figura 29. La formación de conidios en medio líquido por la cepa *cat-2^{RIP}*. (A) Las cepas *cat-2^{RIP}* y silvestre se crecieron en medio MV/sacarosa y se cuantificó el número de conidios libres a diferentes tiempos. (B) Número de conidios libres formados en la etapa estacionaria del crecimiento en medio MV/sacarosa-oleato. (C-D) Imágenes de los conidios formados por las cepas silvestre y *cat-2^{RIP}* en medio MV/sacarosa (0.2%) - oleato (0.5%).

Al mismo tiempo que se forman los conidios durante la etapa del crecimiento estacionario, el micelio muestra signos de autofagia, como es la formación profusa de vacuolas y de septos que delimitan las células viables de los segmentos de las hifas que se mueren. Sin embargo, no se observaron diferencias en la abundancia o en la distribución ni de las vacuolas ni de los septos formados por las cepas silvestre y *cat-2^{RIP}* (Fig. 28 E). Tampoco encontramos diferencias al evaluar la viabilidad de las hifas con colorantes vitales como el azul de tripano y el azul de metileno (Fig. 28 F).

La formación de peritecios durante el desarrollo sexual de las cepas *cat-2*^{RIP}

Estudiamos la participación de la CAT-2 en el desarrollo sexual del hongo. Las cepas *cat-2*^{RIP} de ambos sexos fueron fértiles como receptoras (cepas femeninas) y donadoras (masculinas), tanto en cruza homocigas como heterocigas. No se observaron alteraciones morfológicas ni de los peritecios ni de las ascosporas en las cepas mutantes y las ascosporas fueron viables y germinaron con la misma frecuencia que las silvestres.

Para seguir el proceso de reproducción sexual con más detalle, se inocularon conidios de las cepas silvestre y *cat-2*^{RIP} en cajas con medio SC. Los conidios fueron plaqueados o inoculados por punto para obtener colonias concéntricas. Las colonias fueron fertilizadas después de 6 días de crecimiento con una suspensión de conidios del sexo opuesto, ya sea cubriendo toda la colonia de forma homogénea, o bien, con gotas de 10 µl en áreas definidas de las colonias. Se analizó el desarrollo de los cuerpos fructíferos en el transcurso de los siguientes 8 días, así como en las diferentes regiones de las colonias concéntricas. No se encontraron diferencias en el número de los peritecios formados por ambas cepas durante el desarrollo sexual. Tampoco se observaron diferencias en el momento de su formación ni en su distribución a lo largo de las colonias concéntricas (Fig. 30 A y B). También estudiamos la formación de los peritecios mediante experimentos de confrontación de las distintas cepas. Para ello, las cepas de ambos sexos se inocularon en los extremos de cajas de petri con medio SC y se evaluó la formación de los peritecios en la zona de contacto entre las dos cepas. Tampoco encontramos diferencias en los cuerpos fructíferos que se formaron con respecto a la cepa silvestre ni en cruza homocigas ni heterocigas (no se muestra).

Asimismo, estudiamos la participación de la CAT-2 en la formación de los protoperitecios. Los protoperitecios se pudieron detectar en ambas cepas después de 5 días de crecimiento y fueron evidentes después de los 6 días. No se observaron diferencias importantes en su número ni en su tamaño (Fig. 30 A y C; Fig. 31 A y B). De igual forma, evaluamos la formación de los protoperitecios a lo largo de diferentes regiones de colonias concéntricas inoculadas por punto. El número de peritecios formados después de 6 días y su distribución fue semejante para ambas cepas (Fig. 30 C y D). Además se evaluó la formación de las especies reactivas del oxígeno durante el desarrollo de los protoperitecios y la participación de la CAT-2 en este evento. La formación de las especies reactivas del oxígeno se examinó mediante el diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (H₂DCFDA). Este compuesto es permeable a las células y una vez dentro de ellas sus grupos acetato son removidos (H₂DCF), lo cual limita su salida. El H₂DCF es susceptible de ser oxidado (DCF) por diferentes especies del oxígeno, entre ellas el H₂O₂. Cuando esto ocurre la molécula es fluorescente.

Pudimos detectar un aumento en la fluorescencia de los protoperitecios con respecto a la del micelio vecino. Esta fluorescencia fue evidente tanto en protoperitecios de 1 día (después de 6 días de crecimiento, Fig. 31 C y D, sólo mostrado para la cepa *cat-2^{RIP}*) como de 3 días (después de 8 días, Fig. 31 E y F). Esto sugiere que durante el desarrollo de los protoperitecios se forman algunas especies del oxígeno reactivas. Sin embargo, la emisión de fluorescencia de los protoperitecios no se vio modificada por la ausencia de la CAT-2 en las cepas *cat-2^{RIP}* (Fig. 31 E y F). Esto sugiere que la enzima no participa en el proceso, o bien, que su función puede ser reemplazada por otra actividad antioxidante en las cepas mutantes.

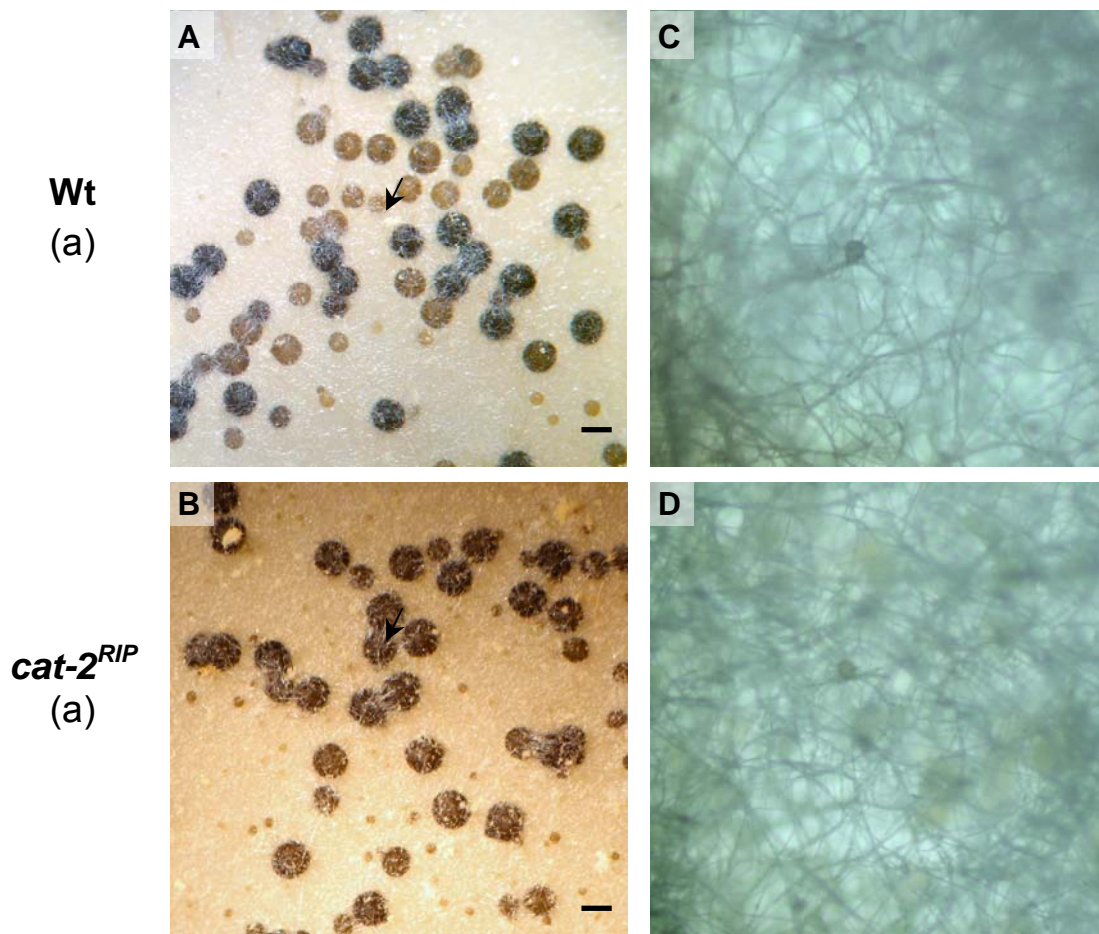


Figura 30. La formación de peritecios y protoperitecios en la cepa *cat-2^{RIP}*. Las cepas silvestre (A y C) y *cat-2^{RIP}* (B y D) fueron sembradas en placas (A y B) o inoculadas por punto (C y D) en medio SC. Después de 6 días el centro de las colonias fue analizado bajo el microscopio estereoscópico (C y D) o las colonias fueron fertilizadas con una suspensión de conidios del sexo opuesto y analizadas después de 6 días (A y B). Las imágenes equivalentes tienen el mismo aumento, barra = 0.1mm. Sólo se indica la cepa receptora.

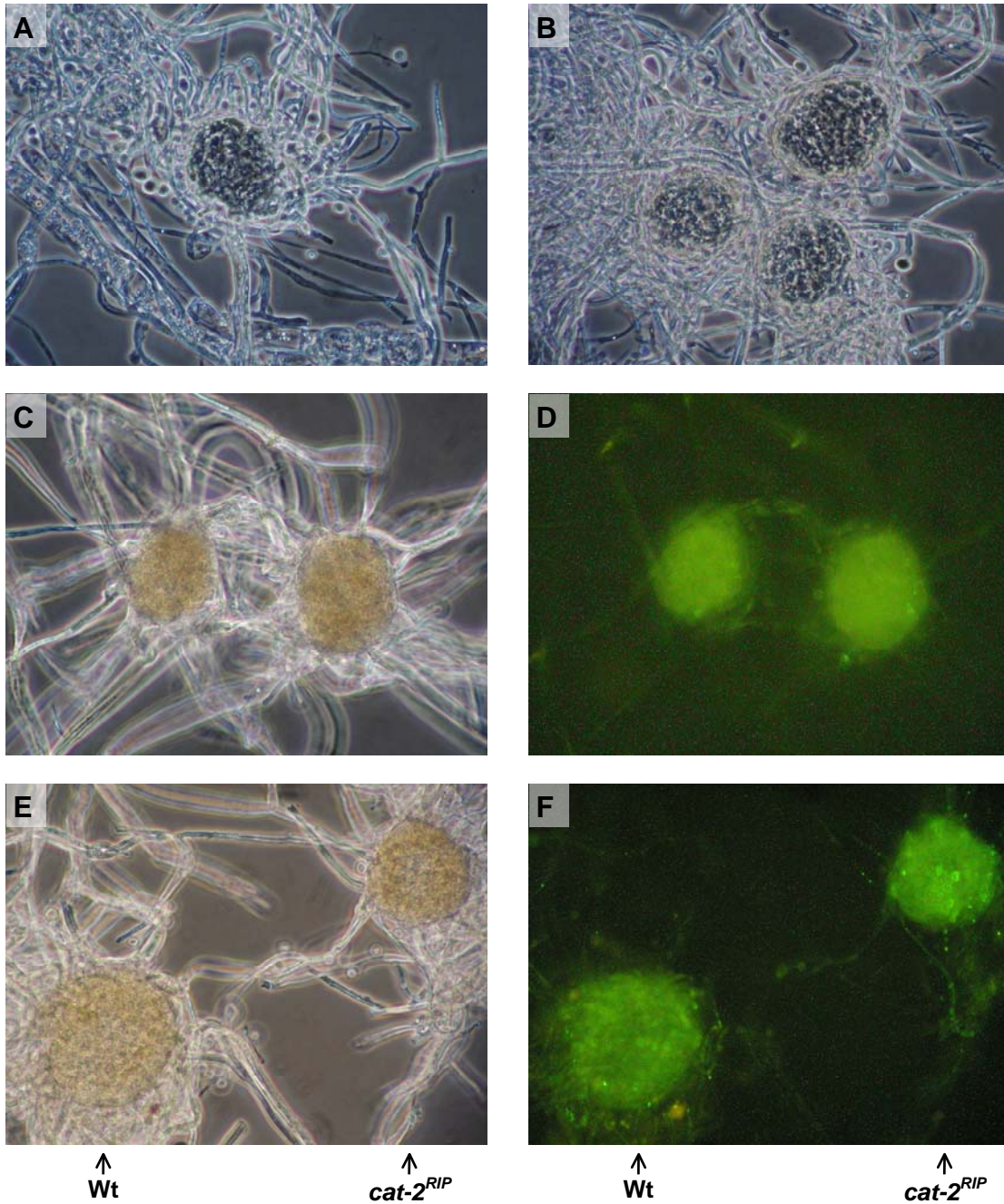


Figura 31. Las especies del oxígeno reactivas durante la formación de los protoperitecios de *N. crassa*. (A) Las cepas silvestre y (B) *cat-2^{RIP}* fueron inoculadas en medio SC y después de 6 días sus protoperitecios fueron analizados bajo el microscopio óptico. Las muestras del micelio de 6 (C y D) y 8 (E y F) días fueron incubadas con H₂DCFDA (20 min) y se analizaron con microscopía de contraste de fases (C y E) y de fluorescencia (D y F). Las imágenes tienen el mismo aumento. En (E y F) se compara la fluorescencia de un protoperitecio silvestre y uno mutante *cat-2^{RIP}* mientras que en (C y D) sólo se muestra la cepa *cat-2^{RIP}*.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La CAT-2 de *N. crassa* es una catalasa-peroxidasa

La catalasa-2 de *N. crassa* se describió inicialmente como una enzima de rápida movilidad electroforética (en geles electroforéticos en condiciones no desnaturizantes) presente en los extractos de la etapa estacionaria del crecimiento (Simmons *et al.*, 1987). Con base en los polimorfismos naturales presentes en las cepas silvestres provenientes de Oak Ridge y de Mauriceville, se demostró la segregación mendeliana de la CAT-2 y se mapeó el locus *cat-2* en el brazo derecho del cromosoma VII (Simmons *et al.*, 1987). Asimismo, se demostró que la CAT-1, la CAT-2 y la CAT-3 son codificadas por tres genes distintos. También se encontró que la CAT-2 posee una masa molecular de ≈ 165 kDa con un pI cercano a 5.4 y se observó su inducción por choque térmico y durante la conidiación (Chary y Natvig, 1989).

La primera parte de nuestra investigación consistió en definir la identidad de la CAT-2. Para ello, la enzima fue purificada y parcialmente caracterizada. El tamaño de la enzima, su espectro de absorción, sus propiedades catalíticas y su sensibilidad ante distintos inhibidores fueron congruentes con una catalasa-peroxidasa más que con una catalasa monofuncional. Asimismo, la determinación de una porción interna de su secuencia de aminoácidos y la clonación del gen *cat-2* demostró de manera concluyente que la enzima es una catalasa-peroxidasa.

La estructura del gen *cat-2* y de la enzima

La masa molecular de la CAT-2 calculada mediante una regresión lineal basada en la movilidad electroforética de la enzima en geles de electroforesis desnaturizantes fue de 89 kDa y después de entrecruzar la enzima con diferentes concentraciones de glutaraldehído se observó una forma de la enzima cuya masa coincide con la de un homodímero (Montes de Oca y Hansberg, resultados sin publicar). Esta masa es semejante a la descrita para la enzima nativa (Chary y Natvig, 1989) y sugiere que la forma funcional de la enzima es un homodímero. La masa molecular de la enzima que se predice con base en la secuencia del gen clonado fue de 83.4 kDa (≈ 84 kDa con el grupo hemo). Esta dimensión coincide con la de otras catalasa-peroxidasa diméricas y con la de la mayoría de las enzimas de los hongos (Fraaije *et al.*, 1996; Scherer *et al.*, 2002; Paris *et al.*, 2003), siendo la excepción la enzima tetramérica de *S. tritici* cuyas subunidades son de 61 kDa (Levy *et al.*, 1992). En cuanto a la estructura cuaternaria, además de esta enzima tetramérica, en los hongos se han descrito enzimas diméricas y monoméricas (Fraaije *et al.*, 1996; Paris *et al.*, 2003).

También se evaluó la glicosilación de la CAT-2 mediante diferentes lectinas capaces de detectar residuos de α -manosa, α -glucosa, α -galactosa, α -galactosamina, N-acetil-glucosamina y N-acetil-galactosamina. Ninguna de las lectinas fue capaz de unirse a la CAT-2, indicando que la enzima no contiene estos residuos. Asimismo, el reactivo de Schiff (tinción de PAS), que revela grupos aldehídos, fue incapaz de teñir a la CAT-2, lo que sugirió que la enzima no está glicosilada (Montes de Oca, 1999). Otra catalasa-peroxidasa de un hongo en la que también se evaluó la glicosilación fue la de *P. simplicissimum* y en ella tampoco se detectaron carbohidratos unidos (Fraaije *et al.*, 1996).

El patrón de absorción de la CAT-2 indicó que es una hemo-proteína, con una banda de *Soret* típica de 400 nm (Fig. 2 A). Ambas, las catalasas y las catalasa-peroxidadas, son hemo-proteínas; sin embargo, sus espectros electrónicos son distintos y esto se refleja en sus valores de R_z (A_{406}/A_{280}), siendo para las catalasas monofuncionales cercano a 1 mientras que para las catalasa-peroxidadas es cercano a 0.5 (Zamocky y Koller, 1999). El valor de R_z de la CAT-2 fue de 0.46. Este bajo valor de R_z tradicionalmente ha sido interpretado como una unión del grupo hemo no estequiométrica (0.5 grupos hemo/monómero) y probablemente es el resultado de que las enzimas pierden el grupo hemo con facilidad *in vitro* (Claiborne y Fridovich, 1979; Welinder, 1991; Marcinkeviciene *et al.*, 1995; Youn *et al.*, 1995; Obinger *et al.*, 1997; Zamocky y Koller, 1999). El hemo de la CAT-2 pudo ser obtenido con acetona ácida, sugiriendo que, al igual que las peroxidadas de las plantas y los microorganismos, su unión con la proteína no es covalente (Hultquist y Morrison, 1963). El perfil de elución del grupo hemo por HPLC mostró dos picos con tiempos de retención distintos (Fig. 2 C). Uno de ellos salió de la columna junto con la protoporfirina-IX (hemo-b), pero la mayor parte del hemo correspondió a una porfirina dihidroxi / dicarboxílica, que es más hidrofílica que la protoporfirina-IX y que tiene un espectro de absorción distinto (Fig. 2 B). Si bien, la mayor parte de las catalasa-peroxidadas tienen como grupo prostético el hemo-b (Claiborne y Fridovich, 1979; Welinder, 1991; Levy *et al.*, 1992; Cendrin *et al.*, 1994; Marcinkeviciene *et al.*, 1995; Youn *et al.*, 1995; Obinger *et al.*, 1997; Yamada *et al.*, 2002; Bertrand *et al.*, 2004), se ha demostrado la presencia de un grupo hemo modificado en la catalasa-peroxidasa de *Burkholderia pseudomallei* que presumiblemente se genera por una oxidación y que resulta en un hemo más polar (Carpena *et al.*, 2003). Se sabe que el hemo-b puede ser modificado por oxidación y como resultado se generan hemo-proteínas que contienen una mezcla de grupos hemo (Loewen *et al.*, 1993; Lledías *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2004). Por otra parte, sabemos que la CAT-2 es modificada por el oxígeno en singulete de manera semejante a la CAT-1, en donde se ha demostrado que la oxidación ocurre en el grupo hemo (Lledías *et al.*, 1998).

A partir de la secuencia de una porción interna de la CAT-2 pudimos clonar el gen *cat-2*. En concordancia con los experimentos de Simmons y cols (1987) que mapearon el gen *cat-2*, la secuencia genómica reveló que el gen *cat-2* se localiza en el *contig* 3.330 (*supercontig* 23) que corresponde al cromosoma VII. Está flanqueado en un extremo por *poi-2* (4.8 kb arriba del gen *cat-2*, en la hebra opuesta), un marcador del cromosoma VII que coincide con un marco de lectura abierto (NCU05768.1) que tiene semejanza con una metionina-aminopeptidasa. Por el extremo opuesto lo flanquean *tom-6* (2.5 kb abajo de *cat-2*, en la misma hebra), una proteína del complejo TOM (de translocación de la membrana externa de las mitocondrias) (Dembowski *et al.*, 2001), y un marco de lectura abierto (2.6 kb abajo de *cat-2*, en la hebra opuesta) que predicablemente codifica para una proteína (NCU05771.1) con semejanza a las proteínas HMG (*High mobility group*). Este marco de lectura se traslapa con *tom-6*. No se conoce la posición relativa del supercontig 23 en el mapa físico del cromosoma VII.

La secuencia de aminoácidos de la CAT-2 indica que, al igual que en las otras catalasa-peroxidasas, los aminoácidos conservados esenciales del sitio activo (Arg 87, Trp 90 e His 91, Fig. 32 A) y el quinto ligando del hemo (His 279, Fig. 32 B) están presentes sólo en el dominio N-terminal (Figuras 13 y 32) por lo que ambas actividades deben residir en él.

El plegamiento estructural característico de la familia de peroxidasas de las plantas y los microorganismos se caracteriza por 10 hélices α conservadas (hélices A-J) dentro de las que se localiza el grupo hemo. Esta estructura se conserva en cada uno de los extremos de las catalasa-peroxidasas. Las diferencias más importantes con las peroxidasas se encuentran en la superficie del extremo N-terminal de las catalasa-peroxidasas, donde existe una serie de inserciones (asas y extensiones) entre las hélices α que se localizan hacia la superficie de la molécula y limitan el acceso de los sustratos al sitio activo. Como consecuencia, el grupo hemo está oculto de forma más parecida al sitio activo de las catalasas que al de las peroxidasas. Dos de estas asas (LL1 y LL2) cubren un canal que se dirige al sitio activo y mantienen contactos con el extremo C-terminal de la molécula (Welinder, 1991; Yamada *et al.*, 2002; Carpena *et al.*, 2003). La secuencia de la CAT-2 sugiere que la estructura secundaria y terciaria de la enzima son semejantes a la de las demás catalasa-peroxidasas. La diferencia más notable con respecto a la mayoría de las catalasa-peroxidasas fue una inserción de 26 aminoácidos entre las hélices D y E que presumiblemente se localiza en el asa LL1 (Fig. 13 y Fig. 33 D). Una inserción semejante también está presente en otras enzimas de los hongos y, aunque de un tamaño menor, en las de las bacterias *Xylella*, *Xanthomonas*, *Burkholderia* y *Pseudomonas* (Mostrado en la Fig.13 para *B. cepacia*).

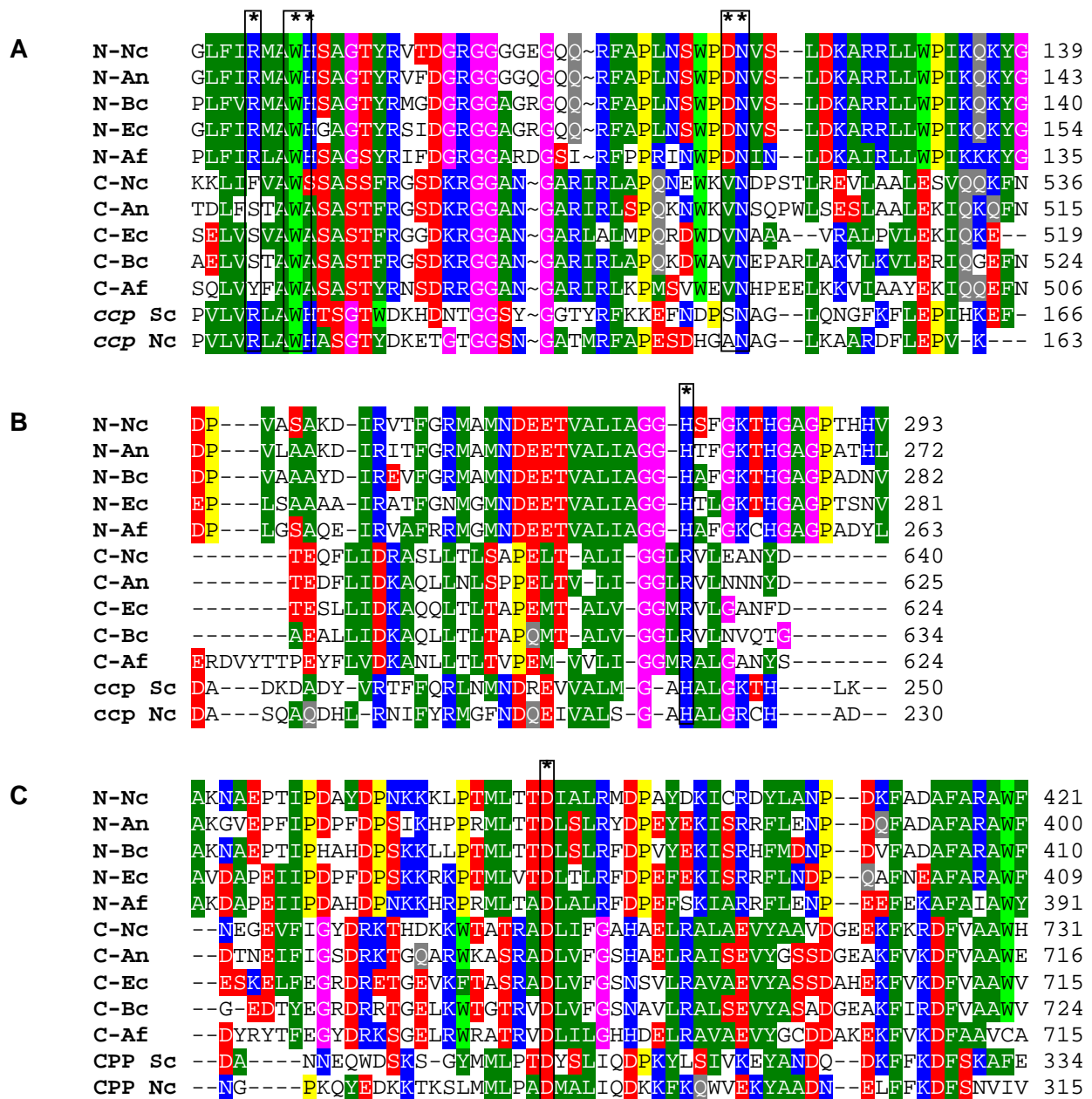


Figura 32. Alineamiento de los extremos N- y C- terminal de algunas catalasa-peroxidasas y citocromo c peroxidasas. Las secuencias de aminoácidos de 33 catalasa-peroxidasas fueron alineadas con las citocromo c peroxidasas (CCP) de *S. cerevisiae* y de *N. crassa* y se definieron los extremo N-terminal y C- terminal. Estos extremos fueron separados (N- y C-) y realineados con las CCP. Se muestran tres segmentos representativos del alineamiento de 5 catalasa-peroxidasas con las CCP (A, B y C). Se indican algunos de los residuos importantes para la catálisis de las catalasa-peroxidasas (* en A) así como para coordinar el grupo hemo (* en B y C). Nc- *N. crassa*, An- *A. nidulans*, Ec- *E. coli*, Bc- *B. cepacia*, Af- *A. fulgidus* y Sc- *S. cerevisiae*.

Para ilustrar mejor estas características generamos un modelo estructural tridimensional de la CAT-2. Éste se construyó con base en la identidad de la CAT-2 con proteínas homólogas cuya estructura se conoce (como las catalasa-peroxidasas de *B. pseudomallei*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Haloarcula marismortui* *Synechococcus sp.*, el dominio C-terminal de la HPI de *E. coli* y peroxidasas como la citocromo *c* peroxidasa de *S. cerevisiae* y la peroxidasa de ascorbato) y se optimizó con la estructura de la enzima de *B. pseudomallei* (Carpena *et al.*, 2003), que tiene un 60% de identidad en su secuencia de aminoácidos con la CAT-2 (Fig. 33). El modelo de la CAT-2 se ajustó bien al de las demás catalasa-peroxidasas (Fig. 33 F, mostrado sólo para la enzima de *Burkholderia*) y en él se pueden observar muchas de las interacciones intramonoméricas descritas como importantes para la formación de los dímeros, así como la ubicación de los aminoácidos importantes para la catálisis y la coordinación del grupo hemo. Destaca en el modelo de la CAT-2 la extensión adicional de 26 aminoácidos (del asa LL1) que no tiene contraparte en las demás catalasa-peroxidasas (Fig. 33 F y mostrada en amarillo en D-E). En el primer modelo generado, esta extensión protruye de la estructura medular sin un arreglo definido; sin embargo, cuando la estructura se optimizó con la enzima de *Burkholderia* que tiene una inserción menor en esa región, la extensión formó un asa LL1 más amplia que cubre la hendidura formada por los dos dominos del monómero (Fig. 33 D). El asa LL1 se encuentra localizada en el dominio N- terminal y en ella se encuentran algunos residuos que se encuentran en la ruta de acceso al sitio activo y que median algunas de las interacciones importantes con el extremo C- terminal (Yamada *et al.*, 2002).

Figura 33. Modelo de la estructura tridimensional de la CAT-2 (Página siguiente).

(A) Representación en listones del dímero de la CAT-2 con sus monómeros en distinto color.
(B) Imágenes rotadas 90° en el plano de Y y (C) en el plano de X. (D) Monómero y (E) dímero de la CAT-2 en los que se ilustra su estructura secundaria (verde, láminas β ; azul claro, hélices α y azul oscuro, hélices 3_{10}) y la extensión adicional del asa LL1 de la CAT-2 (amarillo). En (F) se muestra la superposición de la cadena principal de la CAT-2 (azul) con la KatG de *B. pseudomallei* (rojo). Las flechas indican el asa LL1 de la CAT-2 (punta abierta) y la KatG (punta cerrada). En todas la imágenes se muestra el grupo hemo representado en bastones y esferas.

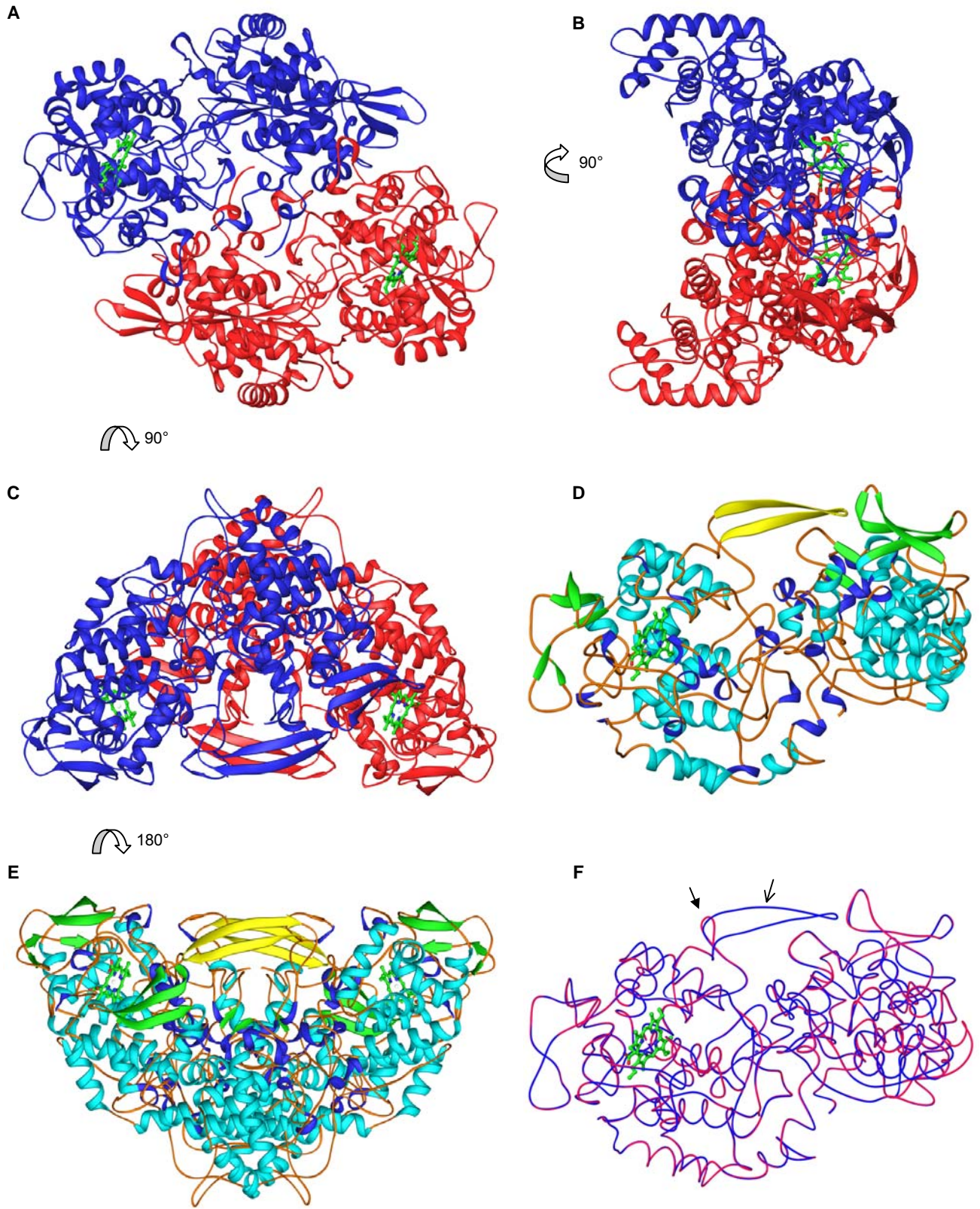


Figura 33. Modelo de la estructura tridimensional de la CAT-2 (página anterior).

Propiedades catalíticas de la enzima

Las catalasa-peroxidasas son capaces de reducir los hidroperóxidos usando agentes reductores como el H_2O_2 (reacción de catalasa) o sustratos como el guaiacol, la bencidina, la dianisidina, el 4-cloronaftol, las hidrazonas, algunos alcoholes y el ascorbato (Zou *et al.*, 1999). Algunas enzimas también pueden oxidar algunos fenoles y anilinas (Regelsberger *et al.*, 1999), nucleótidos de purinas como el NADH y el NADPH (Levy *et al.*, 1992; Marcinkeviciene *et al.*, 1995) o incluso proteínas, como el citocromo *c* (Brown-Peterson y Salin, 1993). La CAT-2 mostró actividad de catalasa y de peroxidasa. Pudo reducir el peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos como el *ter*-butil hidroperóxido y fue capaz de usar como agentes reductores compuestos aromáticos (como la dianisidina, el guaiacol, la diaminobencidina, el ABTS) y el ascorbato (Tabla 2), siendo, este último, el único compuesto que se encuentra en las células.

Se ha demostrado que algunas catalasa-peroxidasas son capaces de llevar a cabo otro tipo de reacciones de oxido-reducción. Por ejemplo, algunas enzimas tienen actividad de halogenasas, oxidan cloruros, bromuros o yoduros (Jakopitsch *et al.*, 2001); algunas tienen actividad de NADH oxidasa, es decir, son capaces de oxidar el NADH a partir del oxígeno (Singh *et al.*, 2004), mientras que otras son capaces de catalizar la reducción del Mn^{II} en Mn^{III} de manera dependiente del H_2O_2 pero independiente del grupo hemo. Esta actividad de peroxidasa de manganeso se ha asociado al extremo C-terminal de algunas enzimas (Magliozzo y Marcinkeviciene, 1997; Zou y Schrempf, 2000). La CAT-2, sin embargo, fue incapaz de tomar NADH o NADPH como agentes reductores en presencia de oxígeno (reacción de oxidasa) o de H_2O_2 , (reacción de peroxidasa). La enzima tampoco tuvo actividad de manganeso peroxidasa.

Si bien, la CAT-2 tiene una actividad de peroxidasa considerable, su actividad de catalasa fue más eficiente que la de las peroxidasas monofuncionales, por lo que claramente es una enzima bifuncional. Por ejemplo, dentro de las peroxidasas de su misma familia, las enzimas que tienen actividad de catalasa, como la peroxidasa de raíz fuerte (clase III), tienen una k_{cat}/K_m de $10^2 - 10^3 M^{-1} s^{-1}$ (Hernández-Ruiz *et al.*, 2001) que es por lo menos tres órdenes de magnitud menor que la de la CAT-2. La actividad de catalasa de algunas otras peroxidasas puede ser sustancialmente mayor. Tal es el caso de la cloroperoxidasa, una hemo-enzima multifuncional que además de su actividad de halogenasa tiene una alta actividad de catalasa. La actividad de catalasa de esta enzima puede ser comparable con la de algunas catalasa-peroxidasas (Sun *et al.*, 1994; Hillar *et al.*, 2000); no obstante, la eficiencia catalítica de la CAT-

2 fue cerca de dos órdenes de magnitud mayor que la de la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Sun *et al.*, 1994).

Además de la dualidad funcional de la enzima, sus propiedades cinéticas ante el H_2O_2 fueron más semejantes a las de las catalasa-peroxidosas que a las de las catalasas. La eficiencia catalítica de las catalasas ($k_{\text{cat}}/K_m \approx 10^6 - 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) suele ser un orden de magnitud mayor que la de las catalasa-peroxidosas ($k_{\text{cat}}/K_m \approx 10^5 - 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Zamocky y Koller, 1999; Hillar *et al.*, 2000) y, en términos generales, las catalasa-peroxidosas tienen una afinidad mayor por el H_2O_2 . Su K_m aparente es uno o dos órdenes de magnitud menor que la de las catalasas (Ogura y Yamazaki, 1983; Cendrin *et al.*, 1994; Fraaije *et al.*, 1996; Shima *et al.*, 1999). En la tabla 6 se muestran algunos parámetros cinéticos de las catalasas y las catalasa-peroxidosas que se comparan con los obtenidos mediante un ajuste *Michaelis-Menten* para la CAT-2. La eficiencia catalítica de la CAT-2 fue por lo menos 10 veces menor que la de la CAT-1, una catalasa monofuncional de *N. crassa*; sin embargo, ésta fue relativamente alta en comparación con las catalasa-peroxidosas de las bacterias e incluso con la de varias catalasas monofuncionales. Asimismo, la CAT-2 tuvo una afinidad mayor por el H_2O_2 que las catalasas y alcanzó el nivel de saturación máxima en concentraciones milimolares. Si bien, estas características coinciden más con las de las catalasa-peroxidosas, la CAT-2 no fue una catalasa-peroxidasa típica, particularmente en su eficiencia catalítica. La caracterización de otras catalasa-peroxidosas de hongos (Levy *et al.*, 1992; Fraaije *et al.*, 1996) no incluye los parámetros como la eficiencia catalítica (o la k_{cat}) de manera que a la fecha no es posible saber si estas características son comunes en las enzimas de los hongos.

Si bien es común que las enzimas con actividad de catalasa sean tratadas como enzimas *Michaelianas*, estas enzimas no siguen una cinética hiperbólica. En primer lugar, su mecanismo catalítico consta de dos reacciones secuenciales y requiere la incorporación ordenada de dos moléculas de sustrato, aunque ambas son H_2O_2 (ver reacciones 1, 4 y 5). En este sentido, el mecanismo catalítico implica una reacción bisustrato en la que se requiere que un producto sea liberado (H_2O) antes de la incorporación del segundo sustrato (reacción de tipo *Ping Pong*). Por otra parte, se ha demostrado que las catalasas monofuncionales sólo siguen una cinética hiperbólica a bajas concentraciones de sustrato (200 mM) y, dependiendo de la estructura de la enzima, arriba de esta concentración su velocidad disminuye (en las catalasas de subunidades pequeñas) o continúa en aumento y sobrepasa la V_{max} calculada (en las catalasas de subunidades grandes) (Switala y Loewen, 2002; Díaz *et al.*, 2005). Si bien, el mecanismo catalítico para la actividad de catalasa de las catalasa-peroxidosas es el mismo que el de las enzimas monofuncionales, se desconoce si las primeras también siguen una cinética

compleja. Fue evidente que el ajuste *Michaelis-Menten* de la CAT-2 no reprodujo los valores experimentales y a altas concentraciones de sustrato la velocidad de la enzima sobrepasó la V_{\max} calculada. En este sentido, la actividad de la CAT-2 fue más semejante a la de las catalasas monofuncionales de subunidad grande que a las catalasas de subunidad pequeña. La actividad de la CAT-2 se ajustó bien a una cinética compleja con dos componentes. Fue claro que el primer componente, el observado a bajas concentraciones de sustrato, no presentó cooperatividad. Sin embargo, fue difícil definir si para el segundo hay cooperatividad, ya que el ajuste con ambas ecuaciones ($n_{H(2)}=1$ ó $n_{H(2)}=1.37$) fue parecido (Fig. 9 y Tabla 3). Esta heterogeneidad cinética podría ser el resultado de dos poblaciones de enzimas (o de sitios activos) con una afinidad distinta por el sustrato, que difieren por lo menos 30 veces; o bien, de una activación por el sustrato.

Tabla 6. Propiedades catalíticas de algunas catalasas y catalasa-peroxidasas.

Enzima	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$)	pH óptimo	
			catalasa	peroxidasa
CAT-2 (<i>N. crassa</i>)	13.0	1×10^7	6.3	4.8
Catalasas				
Archaea ¹	25 - 60 ^a	N.D.	4 - 10	-
Bacterias ²	20 - 500 ^a	$1.3 - 3.6 \times 10^6$	4 - 11	-
Hongos ³	22 ^a	4.1×10^8	4 - 12	-
	200 - 465 ^b	2.2×10^8		
Animales ⁴	80 - 90 ^a	$2 - 7 \times 10^6$		-
	1,290 - 1,390 ^b	1.7×10^7		-
Catalasa-peroxidasas				
Archaea ⁵	2.5 - 8.6	N.D.	6 - 7.5	4.5 - 7.5
Bacterias ⁶	3.9 - 5.9	$9 \times 10^5 - 4.6 \times 10^6$	7 - 7.5	4.6 - 6.5
Hongos ⁷	3.5 - 11	N.D.	6 - 6.5	5.4

¹ (Brown-Peterson y Salin, 1995; Shima *et al.*, 1999; Shima *et al.*, 2001).

² (Loewen y Switala, 1986; Obinger *et al.*, 1999; Switala y Loewen, 2002).

³ (Díaz *et al.*, 2001; Switala y Loewen, 2002).

⁴ (Ogura y Yamazaki, 1983; Switala y Loewen, 2002).

⁵ (Brown-Peterson y Salin, 1993; Cendrin *et al.*, 1994; Kengen *et al.*, 2001).

⁶ (Claiborne y Fridovich, 1979; Hillar *et al.*, 2000; Zou y Schrepf, 2000).

⁷ (Levy *et al.*, 1992; Fraaije *et al.*, 1996).

^a calculada para bajas concentraciones de H_2O_2 (≤ 200 mM).

^b altas concentraciones de H_2O_2 ($\approx M$).

N.D. no determinada.

Al igual que otras catalasa-peroxidadas y a diferencia de las catalasas monofuncionales, la actividad de la CAT-2 fue sensible al pH. Esto ocurrió para ambas actividades y el valor óptimo fue en un pH más ácido para la actividad de peroxidasa que para la de catalasa. Esto se ha observado en la mayoría de las catalasa-peroxidadas. La excepción es la enzima de *H. halobium* cuyo óptimo para la actividad de catalasa es más ácido (pH 6.5) que para la actividad de peroxidasa (pH 7.5) (Brown-Peterson y Salin, 1993).

Por otra parte, la CAT-2 fue poco sensible al inhibidor de las catalasas monofuncionales 3-amino-1,2,4 triazol (Fig. 11 C) y después de 60 min en presencia de una concentración 20 mM de este inhibidor perdió el 50% de su actividad. Este patrón de inhibición fue claramente distinto al de las catalasas monofuncionales que en ese intervalo de tiempo se inactivan completamente; sin embargo, tampoco coincidió con el de la mayoría de las catalasa-peroxidadas que son insensibles a este compuesto. La catalasa-peroxidasa de *A. fulgidus* sí es sensible al 3-amino-triazol (Kengen *et al.*, 2001). Por otra parte, como era de esperarse para una hemo-proteína, la CAT-2 fue sensible al cianuro. Ambas actividades de la enzima, la de catalasa y la de peroxidasa, se inhibieron en presencia de este compuesto lo que indicó que ambas actividades dependen del grupo hemo.

Las catalasa-peroxidadas de los hongos tienen un origen procarionte

Con la clonación del primer gen completo de una catalasa-peroxidasa en un hongo y la demostración de su identidad, quedó probada la presencia de estas enzimas en los organismos Eukaryota. Posteriormente se identificaron otras catalasa-peroxidadas de hongos; sin embargo, no se han descrito en ningún otro linaje eucarionte y están ausentes de los genomas de los otros organismos eucariontes secuenciados a la fecha. Por otra parte, si bien, las catalasa-peroxidadas están presentes en organismos de los tres dominios de los seres vivos: Archaea Eubacteria y Eukaryota, su distribución no es ubicua ni sigue el patrón filogenético de los organismos en que se encuentra. Así, además de los eventos de duplicación del gen en algunas especies, parece ser una enzima que se ha perdido en varios linajes y que está presente en otros debido a eventos de transferencia horizontal. Tal puede ser el caso de las catalasa-peroxidadas en los hongos.

Desde hace tiempo se ha propuesto que las catalasa-peroxidadas forman parte de la familia de peroxidadas de plantas, bacterias y hongos, y que se originaron por un sólo evento de duplicación (en tándem) y fusión del gen de una enzima ancestral de este grupo (Welinder, 1991; Welinder, 1992; Zamocky *et al.*, 2000). La divergencia que existe entre los extremos C- y N-terminal de las catalasa-peroxidadas es mayor que con las otras peroxidadas de la clase I de

esta familia, tales como las ascorbato peroxidases y las citocromo c peroxidases (Fig. 14 B) (Zamocky *et al.*, 2000; Zamocky, 2004). Esto hace pensar que hubo una divergencia considerable entre las dos copias después del evento de duplicación, probablemente previa a la fusión, que dio lugar a las catalasa-peroxidases.

Las relaciones de algunas catalasa-peroxidases de las bacterias coinciden con la filogenia propuesta para las bacterias. Por ejemplo, existen 5 clados que incluyen exclusivamente secuencias de proteobacterias, dos de ellos incluyen sólo γ -proteobacterias y uno es exclusivo de α -proteobacterias (Rhizobiales y Caulobacteriales); sin embargo, también existen clados que incluyen secuencias de distintas *taxa*, tal es el caso de las secuencias de las cianobacterias que se agrupan con otras α - y γ -proteobacterias. Asimismo, existen organismos con dos catalasa-peroxidases en donde sus genes son claramente parálogos (como *Yersinia pestis*), pero también hay casos en que un evento de transferencia horizontal como origen es más plausible (*E. coli* y *Legionella pneumophila*). En cuanto a los genes de las enzimas de las arqueobacterias, los géneros *Haloarcula*, *Halobacterium* y *Archaeoglobus* forman un grupo monofilético con respecto a las demás catalasa-peroxidases, pero la ubicación del gen de la enzima de *Methanosarcina acetivorans* no es clara. Nuestro estudio arrojó resultados semejantes mediante distintos análisis filogenéticos y coincidieron con los estudios hechos por otros grupos (Klotz y Loewen, 2003; Zamocky, 2004).

En cuanto a los hongos, el número de catalasa-peroxidases descritas ha aumentado, se ha demostrado la presencia de intrones en algunos de sus genes (como en *Blumeria graminis*) (S.J. Gurr, comunicación personal) y se han encontrado organismos con dos genes de catalasa-peroxidases (como *M. grisea*) (*Broad Institute*). Por otra parte, se ha encontrado un gen que tiene gran similitud con las catalasa-peroxidases en un hongo basidiomiceto (*U. maydis*). Con base en nuestros análisis filogenéticos iniciales encontramos un árbol filogenético que es el más parsimonioso y cuya topología sugirió un origen cercano común para las catalasa-peroxidases de los hongos y β -proteobacterias como *Burkholderia* (Fig. 15 B). Este resultado, junto con la ausencia de intrones en las (hasta entonces conocidas) catalasa-peroxidases de los hongos, nos llevó a sugerir un origen procarionte, consecuencia de un evento de transferencia horizontal para las catalasa-peroxidases de los hongos. Otro grupo obtuvo posteriormente resultados semejantes mediante análisis distintos (Klotz y Loewen, 2003).

Las catalasa-peroxidases de los hongos forman un grupo monofilético que incluye las secuencias de los ascomicetos y de los basidiomicetos (Fig. 15). No se han descrito catalasa-peroxidases en hongos quitridiomietos o zigomicetos y el gen no se encuentra en el genoma del zigomiceto *Rhizopus oryzae* (*Broad Institute*). Por ello, es probable que las catalasa-

peroxidasas fueron adquiridas por el ancestro común de los ascomicetos y los basidiomicetos. La divergencia de estos dos linajes se ha datado en 1,200 millones de años (Heckman *et al.*, 2001). Asimismo, dentro de este *clado* se pueden ver dos grandes grupos de catalasa-peroxidasas y ambos clados incluyen secuencias de los ascomicetos. Es posible que estos dos grupos sean consecuencia de un evento de duplicación anterior a la divergencia de los ascomicetos y los basidiomicetos. Si así fuera, los hongos como *M. grisea* y *Fusarium graminearum* (anamorfo de *Gibberella zeae*) conservaron ambas copias, mientras que otros perdieron una de ellas (por ejm: *Neurospora*). Es interesante observar que todos los hongos que han conservado las dos copias del gen son patógenos de plantas. Asimismo, existen hongos tanto ascomicetos como basidiomicetos que claramente han perdido ambas copias. En los ascomicetos, el gen está ausente de los genomas de los Archaeascomycetes (como *Schizosaccharomyces pombe*) y de los Hemiascomycetes (*S. cerevisiae* y *Candida spp.*) mientras que en los basidiomicetos, no se ha encontrado catalasa-peroxidasas en los genomas de los Hymenomycetes (*Coprinus cinereus*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Cryptococcus neoformans*) (Broad Institute y DOE Joint Genome Institute).

La CAT-2 es una enzima citosólica

Algunas de las enzimas antioxidantes de los organismos eucariontes han sido localizadas en los peroxisomas, tal es el caso de algunas catalasas, superóxido dismutasas (tanto de Fe como de Mn y de Cu/Zn), peroxirredoxinas y otras peroxidasas (Horiguchi *et al.*, 2001; del Rio *et al.*, 2003). La expresión de la CAT-2 coincidió en ocasiones con la función peroxisomal. Se indujo con sustratos cuyo metabolismo se lleva a cabo en los peroxisomas y se encontró en fases del desarrollo, como la reproducción sexual, en las que hay una proliferación peroxisomal importante en los hongos (Berteaux-Lecellier *et al.*, 1995). Asimismo, la CAT-2 tiene una secuencia que muestra semejanza con la secuencia de localización peroxisomal PTS-1. La secuencia PTS-1 es un tripéptido C-terminal con el consenso SKL; sin embargo, se sabe que existen variaciones sobre este consenso tales como A o C en lugar de S en la primera posición y R o H en lugar de K en la segunda posición. Incluso se han descrito secuencias PTS-1 tetrapeptídicas (Purdue y Lazarow, 2001). En *N. crassa* se ha demostrado que otros aminoácidos pueden formar parte de la secuencia PTS-1 y el consenso se ha extendido a (A/C/G/S) - (H/K/Q/R) - (I/L/V) (de Zoysa y Connerton, 1994). Es interesante observar que varias catalasa-peroxidasas fúngicas tienen una secuencia que sólo difiere de la secuencia PTS-1 en tener una prolina en la primera posición. La secuencia PKL está presente en las enzimas de *N. crassa*, *Podospora anserina* (*P. anserina Genome Project, Institut de Génétique*

et Microbiologie - Université de Paris-Sud XI / CNRS y *Chaetomium globosum* (Broad Institute), mientras que una de las enzimas de *F. graminearum* tienen una secuencia PRL y la de *A. nidulans* una PQL. De hecho, la enzima de *A. fumigatus* tiene una secuencia C-terminal que coincide con el consenso PTS-1 (ARL). Por otra parte, algunos resultados preliminares sugieren que la catalasa-peroxidasa de *P. simplicissimum* está localizada en los peroxisomas (Fraaije *et al.*, 1996). Debido a estas observaciones, nos pareció importante explorar la localización intracelular de la CAT-2.

N. crassa tiene dos poblaciones independientes de microcuerpos. Uno de ellos se caracteriza por tener una densidad de 1.26 g/cm³ y contiene enzimas como la catalasa y la urato oxidasa. El segundo tiene una densidad de 1.21 g/cm³ y contiene las enzimas de la β -oxidación de los ácidos grasos y las del ciclo del glioxilato. Este segundo microcuerpo, al que se denomina glioxisoma, es atípico por que la β -oxidación de los ácidos grasos que ocurre en él no depende de una acil-CoA-oxidasa sino de una acil-CoA-deshidrogenasa (semejante a la de la β -oxidación mitocondrial) de manera que en la primera reacción de esta vía no se forma H₂O₂ (Kionka y Kunau, 1985; Thieringer y Kunau, 1991).

Nosotros evaluamos la localización de la CAT-2, en primer lugar, en hifas que fueron inducidas con acetato; sin embargo, no fue posible rastrear la fracción peroxisomal debido a que en estas condiciones no hubo actividad de urato oxidasa. La CAT-2 se localizó en una fracción cuya densidad fue distinta de la esperada para los peroxisomas y que no coincidió con las fracciones glioxisomal ni mitocondrial. En experimentos en los que la fracción peroxisomal fue evidente, la actividad de la urato oxidasa se localizó en dos fracciones subcelulares, una de ellas con una densidad que coincidió con la descrita para los peroxisomas (1.263 - 1.28 g/cm³) y una segunda con una densidad semejante a la de los glioxisomas (1.191 - 1.209 g/cm³) (Kionka y Kunau, 1985). Nuevamente la CAT-2 sedimentó en las fracciones menos densas de los gradientes de sacarosa y estas fracciones fueron distintas de las fracciones glioxisomal, peroxisomal y mitocondrial, tanto por su densidad como por sus actividades enzimáticas. Estos resultados sugieren que la CAT-2 es una enzima citosólica. Si bien, la inducción de la enzima ocurrió con sustratos que requieren el metabolismo peroxisomal, esta inducción no coincidió temporalmente con la inducción de enzimas típicas de la función peroxisomal. Esto apoya la idea de que la enzima no está asociada con estos organelos.

La microscopía electrónica de las hifas en que se indujo la CAT-2 mostró numerosas vacuolas y cuerpos de *Woronin*. Estas estructuras son derivadas de los peroxisomas y también tienen una actividad de catalasa; sin embargo, su densidad, que es semejante a la de las vacuolas, es incluso mayor que la de los peroxisomas (Jedd y Chua, 2000; Tenney *et al.*, 2000).

Ya que no se observó actividad de la CAT-2 en las fracciones con dicha densidad, pensamos que tampoco está asociada con estas estructuras. La CAT-4 es una catalasa de subunidades pequeñas que se predice del genoma de *N. crassa* y tiene una secuencia PTS-1 típica. Su gen es ortólogo de las catalasas que tradicionalmente son peroxisomales en otros organismos (Klotz y Loewen, 2003) por lo que, presumiblemente, ésta es la actividad de catalasa asociada con los peroxisomas (y cuerpos de *Woronin*) del hongo.

Por otra parte, el tratamiento con las enzimas líticas para digerir la pared celular no fue suficiente para liberar la CAT-2 de las hifas, sino que la mayor parte de la enzima permaneció asociada a los protoplastos. Esto, junto con la ausencia de glicosilación de la enzima, apunta a que tampoco está relacionada con la pared celular del hongo. Estos resultados sugieren que la CAT-2 es una enzima citosólica lo cual concuerda con los resultados que arrojaron distintos algoritmos de predicción de la localización celular de las proteínas con base en su secuencia: *PSORT* (Nakai y Horton, 1999), *TargetP*, *SignalP* (Emanuelsson *et al.*, 2000) y *MitoProt* (Claros y Vincens, 1996) (los detalles se muestran en el apéndice 2). Esta localización celular coincide también con la de la enzima de *A. nidulans*, que fue demostrada mediante una fusión con la proteína verde fluorescente (Scherer *et al.*, 2002).

La función de la CAT-2

En algunos organismos, como en las cianobacterias, la única actividad de catalasa presente es la de la catalasa-peroxidasa. En estas bacterias, la tiorredoxina peroxidasa y la ascorbato peroxidasa son, junto con la catalasa-peroxidasa, las enzimas responsables de eliminar el H_2O_2 . Se ha demostrado que las catalasa-peroxidasas de algunas cianobacterias (*Synechocystis* y *Synechococcus*) son esenciales para contender con altas concentraciones de H_2O_2 que se generan extracelularmente, mientras que las tiorredoxina peroxidasas parecen ser las responsables de eliminar el H_2O_2 que se genera durante su metabolismo (Obinger *et al.*, 1997; Obinger *et al.*, 1999; Tichy y Vermaas, 1999; Perelman *et al.*, 2003).

En las bacterias como *Rhodobacter capsulatus*, *Caulobacter crescentus*, *Salmonella typhimurium*, *Rhizobium etli*, *L. pneumophila* y *Dineococcus radiophilus*, las catalasa-peroxidasas están asociadas con la fase del crecimiento estacionario. Así, en algunos casos se ha demostrado que son esenciales para la supervivencia o para la resistencia ante el H_2O_2 en esta etapa (Hochman *et al.*, 1992; Steinman *et al.*, 1997; Bandyopadhyay y Steinman, 2000; Yun y Lee, 2000; Vargas *et al.*, 2003).

La respuesta de defensa de muchos organismos ante los patógenos incluye la formación de especies de oxígeno reactivas como el superóxido y el óxido nítrico que reaccionan para

formar otras como el H_2O_2 , el ácido peroxinitroso o el HOCl que son más reactivas y/o capaces de atravesar membranas celulares. Las catalasa-peroxidases pueden actuar como factores de virulencia importantes ya que son capaces de descomponer algunas de estas moléculas. Esto se ha sugerido para catalasa-peroxidases como la KatP de *E. coli*, que está codificada en un plásmido de virulencia de las cepas que causan la colitis hemorrágica, así como para la catalasa-peroxidasa de *Y. pestis*, el agente causal de la peste bubónica (Brunner *et al.*, 1996; García *et al.*, 1999). Se ha demostrado que algunas catalasa-peroxidases, como las de *L. pneumophila* y *M. bovis* (Wilson *et al.*, 1995; Bandyopadhyay y Steinman, 1998; Bandyopadhyay *et al.*, 2003) o las de algunos patógenos de plantas como *Agrobacterium tumefaciens* (Xu y Pan, 2000) son factores importantes de virulencia.

Uno de los aspectos más estudiados de las catalasa-peroxidases es su relación con la isoniazida (hidrazida de ácido isonicótico o INH) que es el principal medicamento empleado en el tratamiento de la tuberculosis. Se sabe que la INH es una droga que requiere ser oxidada para ser activa y la catalasa-peroxidasa (KatG) es el único agente conocido capaz de llevar a cabo dicha oxidación. Así, la resistencia de las cepas de *Mycobacterium* a la INH se debe fundamentalmente a la pérdida de la función de la catalasa-peroxidasa (Zhang *et al.*, 1992; Heym *et al.*, 1993; Heym *et al.*, 1995).

La función de las catalasa-peroxidases en los hongos se ha estudiado poco y en los casos estudiados, la ausencia de una catalasa-peroxidasa no ha generado un fenotipo evidente (Scherer *et al.*, 2002; Paris *et al.*, 2003). Esto se puede deber a que la respuesta antioxidante de los hongos incluye varias enzimas que son capaces de proteger a la célula del H_2O_2 . *N. crassa* cuenta con más de 10 enzimas que pueden descomponer el H_2O_2 . Estas enzimas pueden diferir en su localización celular, en su eficiencia catalítica y en su afinidad por el H_2O_2 . Por ejemplo, se sabe que las peroxirredoxinas y las glutatión peroxidases alcanzan el 50% de su actividad máxima en concentraciones de H_2O_2 de 10^{-5} M (Maddipati y Marnett, 1987; Yang *et al.*, 2002) mientras que las hemo-peroxidases de las plantas lo hacen en una concentración de 10^{-3} M (Hiner *et al.*, 1995), las catalasa-peroxidases en un intervalo 10^{-3} - 10^{-2} M y las catalasas de 10^{-2} M – 1 M.

La sensibilidad de la cepa mutante sin CAT-2 ante diferentes concentraciones de H_2O_2 o de un peróxido orgánico fue la misma que la de las cepas silvestres y, a pesar de la fuerte inducción que se observa de la CAT-2 en los sustratos como el metanol y el ácido úrico, no se observó que su crecimiento se viese afectado en estos medios. Es probable que la redundancia funcional permita complementar la ausencia de la CAT-2 con otras actividades antioxidantes. Las catalasas monofuncionales podrían contender con concentraciones

semejantes de H₂O₂ ya que tienen una afinidad por el H₂O₂ semejante a la CAT-2. Otras peroxidasa podrían contender con peróxidos distintos del H₂O₂.

Se ha demostrado que las catalasa-peroxidasa son capaces de reducir al peroxinitrito (ONNO⁻) y contender con la tensión que generan las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Wengenack *et al.*, 1999). Por ello, evaluamos la sensibilidad de las cepas mutantes *cat-2^{RIP}* ante un sistema en el que se generan especies como el NO[·], NO₂[·], NO₃, N₂O₃, N₂O₄ y el ONOO⁻ (ONOOH) después de protonar el nitrito (Ehrt *et al.*, 1997; Halliwell y Gutteridge, 1999). No se observó ninguna diferencia entre la viabilidad de las cepas mutantes y la silvestre, lo que hace suponer que la CAT-2 no participa en la remoción de estas moléculas.

La condición en que probablemente más se indujo la CAT-2 fue como consecuencia de un choque térmico. En un choque térmico de 45°C la inducción fue relativamente rápida y alcanzó sus niveles máximos después de 30 min. La regulación de los genes en respuesta al calor ocurre en buena medida a nivel transcripcional. En los hongos, se conocen dos elementos reguladores en *cis* que son los principales mediadores de esta regulación, los elementos de choque de calor HSE (del inglés *heat shock element*) y los elementos de respuesta al la tensión STRE (*stress response element*) (Estruch, 2000; Moye-Rowley, 2003). El factor de transcripción HSF (*heat shock factor*) está conservado en los organismos eucariontes y es el factor que se une al elemento HSE, mientras que Msn2/Msn4 forman el factor de transcripción de respuesta general al estrés que se une a los elementos STRE. Ambos factores de transcripción se unen a sus elementos *cis* y regulan genes en respuesta al choque de calor y a otros estímulos como la tensión oxidativa (Pirkkala *et al.*, 2001; Moye-Rowley, 2003). La secuencia del promotor del gen *cat-2* reveló la presencia de varias secuencias putativas STRE y HSF, lo que es coherente con la regulación del gen.

Numerosas evidencias indican que la tensión oxidativa participa de manera importante en la muerte celular generada por la tensión con calor. Por una parte, muchos de los elementos que participan en la regulación de la respuesta ante la tensión oxidativa y por calor son comunes y existe una protección cruzada entre deferentes tipos de estrés (Estruch, 2000; Moye-Rowley, 2003). Asimismo, se ha demostrado que especies de oxígeno reactivas, como el anión superóxido, se generan como consecuencia del choque térmico (Lin y Kapoor, 1992) y que estas especies se generan sobre todo en la cadena respiratoria (Davidson y Schiestl, 2001). También se ha demostrado que numerosas enzimas antioxidantes son importantes para contender con el choque térmico. Por ejemplo, las cepas mutantes de *S. cerevisiae* que carecen de la superóxido dismutasa (Cu/Zn) citosólica (SOD1), de la catalasa citosólica (CTT1) o de la citocromo *c* peroxidasa (mitocondrial, CCP1) son más sensibles ante el choque térmico

que las cepas silvestres. Asimismo, se ha demostrado que la sobreexpresión de los genes SOD1 y CTT1 genera cepas más resistentes al choque de calor (Davidson *et al.*, 1996). En *A. nidulans*, se ha demostrado que la catalasa monofuncional asociada con las esporas, CatA, también se induce por choque térmico y se requiere para la tolerancia al calor de las esporas (Noventa-Jordao *et al.*, 1999).

La actividad de la CAT-2, sin embargo, también fue dispensable en la respuesta ante la tensión por calor. Nuevamente, la redundancia de las enzimas antioxidantes puede explicar este fenotipo. Las catalasas CAT-1 y CAT-3 también se inducen por calor (Michán *et al.*, 2002) y existen por lo menos dos enzimas con actividad de peroxidasa que participan en la respuesta al choque de calor del hongo. Se ha demostrado que una de ellas es inducible por choque térmico y protege a las células del choque de calor y de la tensión oxidativa. También, cuando la enzima se induce por estrés oxidativo se genera termotolerancia (Kapoor y Lewis, 1987; Kapoor *et al.*, 1990; Machwe *et al.*, 2002; Senczuk *et al.*, 2003).

La CAT-2 se regula durante el desarrollo y modula la conidiación sumergida

La actividad de la CAT-2 de *N. crassa* se reguló durante el desarrollo asexual y coincidió con los estadios en donde se forman los conidios, tanto en la fase aérea como en medios líquidos. En los cultivos sumergidos, la inducción de la enzima ocurrió de forma paralela a la acumulación del ARNm, lo que sugiere que la regulación ocurre principalmente a nivel transcripcional; sin embargo, durante la conidiación, particularmente a 37°C, la actividad de la enzima apareció alrededor de 4 h después de que se observó la acumulación del transcrito, lo que sugiere que la regulación también puede ocurrir a nivel postranscripcional. Cuando se indujo la conidiación al exponer el micelio al aire, la acumulación de la enzima se observó tanto en el micelio aéreo como en el micelio adherido y ocurrió justo antes de la aparición de los conidios. Asimismo, la enzima fue abundante en las esporas. Sin embargo, la ausencia de la CAT-2 en las cepas *cat-2^{RIP}* no afectó la formación de los conidióforos ni de los conidios de forma significativa. Esto nos hace pensar que la enzima forma parte de la conidiación más que regularla. En cultivos sumergidos la ausencia de la CAT-2 resultó en una formación mayor de conidios. El proceso de conidiación sumergida se ha estudiado poco y no se conocen los elementos que la regulan ni los que la diferencian de los otros procesos de conidiación. Nosotros observamos que la formación de estas esporas depende de los genes *acon 2*, *acon 3* y *fl* de igual manera que la formación de los conidios en la fase aérea. Asimismo, nuestros resultados sugieren que también durante este proceso las especies reactivas del oxígeno juegan un papel importante.

El desarrollo sexual de *N. crassa* es un proceso complejo que implica la formación de estructuras multicelulares. Otras catalasa-peroxidasa de hongos también están asociadas con este proceso, tal es el caso de *A. nidulans* en donde el gen de la catalasa-peroxidasa *cpeA* se regula por *StuA*, un factor de transcripción que regula tanto el desarrollo asexual como el desarrollo sexual del hongo. Al igual que en *N. crassa*, la catalasa-peroxidasa fue dispensable en el desarrollo sexual; sin embargo, en *A. nidulans* la enzima se localiza en el citosol de las células *Hülle*, las células nodrizas de los cuerpos fructíferos que no tienen contraparte en *N. crassa* (Scherer *et al.*, 2002).

A pesar de que no encontramos una participación directa de la CAT-2 en la modulación del desarrollo sexual, si pudimos demostrar que durante la diferenciación de los protoperitecios ocurre un aumento en la formación de las especies reactivas del oxígeno. Por otra parte, se ha observado que la formación de los protoperitecios de *P. anserina* (Malagnac *et al.*, 2004) y de los cleistotecios (cuerpos fructíferos homólogos de los peritecios) de *A. nidulans* (Lara-Ortiz *et al.*, 2003) requiere la formación de especies reactivas del oxígeno. Las cepas mutantes de un gen homólogo al de las NADPH oxidasas, las enzimas que generan superóxido a partir del NADPH, están bloqueadas en el desarrollo sexual (Lara-Ortiz *et al.*, 2003; Malagnac *et al.*, 2004). Estas evidencias indican que las especies del oxígeno reactivas también son importantes en la regulación de los procesos de diferenciación celular que ocurren durante el desarrollo sexual.

En conclusión, la CAT-3 es la principal actividad de catalasa del crecimiento del hongo, la CAT-1 está asociada principalmente con los conidios, donde es la enzima más abundante, y nuestros resultados indican que la catalasa-peroxidasa CAT-2 es una enzima que está relacionada con las células del hongo que presentan signos de muerte celular.

La muerte celular en los hongos conlleva procesos que involucran la degradación de las hifas, tanto de sus paredes celulares (autólisis) como de sus estructuras subcelulares (autofagia). Los segmentos del micelio que se mueren pueden ser delimitados por septos (y cuerpos de *Woronin* en los ascomicetos) y se piensa que sus elementos pueden ser reciclados y utilizados como nutrientes por las partes viables del micelio (Gow y Gadd, 1995; Pinan-Lucarre *et al.*, 2003; Levine y Klionsky, 2004; Thrane *et al.*, 2004). Se sabe que los procesos de autólisis y autofagia participan de manera importante durante la conidiación (Thrane *et al.*, 2004), en el desarrollo de los cuerpos fructíferos sexuales (Pinan-Lucarre *et al.*, 2003) y fueron evidentes en la etapa del crecimiento estacionario (Fig. 28). Se sabe que la autofagia es un proceso que se induce ante diversos tipos de estrés y se piensa que desempeña un papel

importante para eliminar las macromoléculas o los organelos que resultan dañados como consecuencia. También se considera que es un proceso que evita la formación de especies reactivas del oxígeno ya que secuestra y elimina organelos dañados, como las mitocondrias, que son susceptibles de generar estas moléculas (Brunk y Terman, 2002; Dementhon *et al.*, 2004; Levine y Klionsky, 2004). Es posible que la CAT-2 esté asociada con los procesos de autofagia y autólisis del hongo y que su función sea la de contener las especies del oxígeno reactivas que ahí se generan. Asimismo, la ausencia de la CAT-2 durante la etapa del crecimiento estacionario resultó en un incremento de la conidiación sumergida, lo que establece un vínculo entre la diferenciación celular, la autofagia y las especies reactivas del oxígeno.

APÉNDICES

APÉNDICE 1.

Tabla 7. Origen de las secuencias de los genes y las proteínas empleadas en este trabajo.

Catalasa-peroxidasa	Nº de Acceso ¹	Tamaño
<i>Archaeoglobus fulgidus perA</i>	AE000951	741 aa
<i>Aspergillus fumigatus</i>	AAM95780	759 aa
<i>Aspergillus nidulans CpeA</i>	CAC59821	739 aa
<i>Azotobacter vinelandii</i>	ZP_00089196	740 aa
<i>Blumeria graminis CPX</i>	AAL56991	788 aa
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	NP_767418	779 aa
<i>Burkholderia cepacia katA</i>	AF317697	760 aa
<i>Burkholderia fungorum</i>	ZP_00030148	762 aa
<i>Burkholderia pseudomallei katG</i>	AY040244	748 aa
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>supercontig 1.3</i> ²	749 aa
<i>Caulobacter crescentus CB15</i>	AE005967	737 aa
<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	ZP_00096951	685 aa
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 <i>katP</i> (EHEC)	X89017	736 aa
<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 <i>katG</i>	AE000468	726 aa
<i>Fusarium graminearum</i>	FG02974.1 (contig 1.145) ²	738 aa
<i>Fusarium graminearum</i>	FG03850.1 (contig 1.166) ²	815 aa
<i>Geobacillus (Bacillus) stearothermophilus perA</i>	M29876	735 aa
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	AAR35476	727 aa
<i>Gloeobacter violaceus</i>	NP_925717	735 aa
<i>Haloarcula marismortui</i>	Y16851	731 aa
<i>Halobacterium salinarum</i>	AF069761	720 aa
<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1 <i>perA</i>	AE005159	720 aa
<i>Legionella pneumophila katA</i>	AB017595	750 aa
<i>Legionella pneumophila katB</i>	AF078110	721 aa
<i>Magnaporthe grisea</i>	MG04337.1 (contig 2.820) ²	738 aa
<i>Magnaporthe grisea</i>	MG09834.1 (contig 2.1888) ²	786 aa
<i>Mesorhizobium loti</i>	NC_002678	756 aa
<i>Methanosarcina acetivorans C2A</i>	NC_003552	736 aa
<i>Microbulbifer degradans</i>	ZP_00065382	766 aa
<i>Mycobacterium bovis katG</i>	X83277	740 aa
<i>Mycobacterium fortuitum katGI</i>	Y07865	752 aa
<i>Mycobacterium fortuitum katGII</i>	Y07866	733 aa
<i>Mycobacterium intracellulare</i> (MI85)	M86741	746 aa
<i>Mycobacterium smegmatis katG</i>	U46844	740 aa
<i>Mycobacterium smegmatis katH</i>	AJ311851	748 aa
<i>Mycobacterium</i> sp. PYR-1	AAF20142	737 aa
<i>Mycobacterium tuberculosis katG</i>	NP_336417	740 aa
<i>Neurospora crassa</i> CAT-2	AF459787	753 aa
<i>Neurospora crassa</i> NCM6H12T3 cDNA	AA901970	581 pb
<i>Neurospora crassa</i> NCM10B4T3 cDNA	BF739529	399 pb
<i>Neurospora crassa</i> NCM11D2T3 cDNA	BF739574	286 pb
<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	ZP_00096358	747 aa
<i>Penicillium marneffeii</i> CPE1	AF537129	748 aa
<i>Pirellula</i> sp	NP_865274	857 aa
<i>Podospira anserina</i>	(contig 1205) ³	757 aa
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ZP_00086016	755 aa
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 gene for HPI	NC_002947	751 aa
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. <i>katG</i> DC3000	AE016872	756 aa

Catalasa-peroxidasa	Nº de Acceso¹	Tamaño
<i>Ralstonia metallidurans</i>	ZP_00022082	726 aa
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	CAD27228.1	728 aa
<i>Rhizobium etli</i>	AAL93241	727aa
<i>Rhodobacter capsulatus cpeA</i>	X71420	576 aa
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	NP_945782	736 aa
<i>Salmonella typhimurium katG</i>	X53001	727 aa
<i>Shewanella oneidensis MR-1 katG-1</i>	NC_004347	741 aa
<i>Shewanella oneidensis MR-1 katG-2</i>	NC_004347	728 aa
<i>Sinorhizobium meliloti</i> plasmid pSymA SMa2379	NC_003037	727 aa
<i>Streptomyces coelicolor catC</i>	AF126956	740 aa
<i>Streptomyces reticuli cpeB</i>	Y14317	740 aa
<i>Synechococcus</i> PCC6301	AF197161	720 aa
<i>Synechococcus</i> sp	D61378	720 aa
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	BAA17975	754 aa
<i>Ustilago maydis</i>	UM03399.1 (contig 1.115) ²	719 aa
<i>Vibrio cholerae</i>	NC_002505	724 aa
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	BAC61796	721 aa
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	BAC62111	724 aa
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri str. 306 katG	NC_003919	756 aa
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. campestris katG	NC_003902	748 aa
<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	AAF85031	781 aa
<i>Xylella fastidiosa</i> Temecula1 cpeB	NC_004556	757 aa
<i>Yersinia pestis katY</i>	AF135170	737 aa
<i>Yersinia pestis katG</i>	AE013690	751 aa
<i>Yersinia pestis</i> strain CO92 katY	AJ414156	737 aa

Citocromo c peroxidasa	Nº de Acceso¹	Tamaño
<i>Neurospora crassa</i>	contig 2.195 ²	338 aa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CAA44288	361 aa

¹ Nº de acceso de la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (www.ncbi.nlm.nih.gov) a menos que indique otra fuente.

² *Fungal Genome Initiative, Broad Institute* (www.broad.mit.edu/annotation/fungi/fgi).

³ *Institut de Génétique et Microbiologie - Université de Paris-Sud XI / CNRS, Podospora anserina Genome Project* (<http://podospora.igmors.u-psud.fr/index.html>).

Tabla 8. Origen de las estructuras de las proteínas empleadas en este trabajo.

Catalasa-peroxidasa	Nº de Acceso¹
<i>Burkholderia pseudomallei</i> KatG	1MWV
<i>Burkholderia pseudomallei</i> KatG S324T	1X7U
<i>Escherichia coli</i> HPI (dominio C-terminal)	1U2J - L
<i>Haloarcula marismortui</i>	1ITK
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> KatG	1SJ2
<i>Synechococcus</i> PCC 7942	1UB2

¹ Nº de acceso de la base de datos del PDB (*Protein Data Bank*).

Predicción de la localización celular de la CAT-2 con base en su secuencia

Predicción PSORT II

(Prediction of protein sorting signals and localization sites in aminoacid sequences)

(<http://psort.nibb.ac.jp>) (Nakai y Horton, 1999)

PSORT $k = 9/23$ 52.2 %: citoplásmica
 17.4 %: nuclear
 13.0 %: citoesqueleto
 8.7 %: peroxisomal
 4.3 %: extracelular, incluyendo pared celular
 4.3 %: vacuolar

Resultados de los subprogramas:

[PSG: a new signal peptide prediction method](#)

N-region: length 8; pos.chg 2; neg.chg 1
 H-region: length 8; peak value 1.89
 PSG score: -2.51

[GvH: von Heijne's method for signal seq. recognition](#)

GvH score (threshold: -2.1): -8.35
 possible cleavage site: between 40 and 41

>>> Seems to have no N-terminal signal peptide

[ALOM: Klein et al's method for TM region allocation](#)

Init position for calculation: 1
 Tentative number of TMS(s) for the threshold 0.5: 1
 Number of TMS(s) for threshold 0.5: 0
 PERIPHERAL Likelihood = 2.60 (at 616)
 ALOM score: -1.17 (number of TMSs: 0)

[MITDISC: discrimination of mitochondrial targeting seq](#)

R content: 2 Hyd Moment(75): 14.37
 Hyd Moment(95): 11.84 G content: 4
 D/E content: 2 S/T content: 3
 Score: -4.41

[Gavel: prediction of cleavage sites for mitochondrial preseq](#)

R-2 motif at 42 LRQJHT

[NUCDISC: discrimination of nuclear localization signals](#)

pat4: none
 pat7: PNKKKLP (5) at 377
 bipartite: none
 content of basic residues: 11.6%
 NLS Score: -0.04

[KDEL: ER retention motif in the C-terminus: none](#)

[ER Membrane Retention Signals:](#)

KKXX-like motif in the C-terminus: NAPK

[SKL: peroxisomal targeting signal in the C-terminus: none](#)

[SKL2: 2nd peroxisomal targeting signal: none](#)

[VAC: possible vacuolar targeting motif: none](#)

[RNA-binding motif: none](#)

[Actinin-type actin-binding motif:](#)

type 1: none
 type 2: none

[NMYR: N-myristoylation pattern : none](#)

[Prenylation motif: none](#)

[memYQRL: transport motif from cell surface to Golgi: none](#)

[Tyrosines in the tail: none](#)

[Dileucine motif in the tail: none](#)

[checking 63 PROSITE DNA binding motifs:](#)

Leucine zipper pattern (PS00029): *** found ***
 LIDRASLLTLSAPELTALIGGL at 611
 none

[checking 71 PROSITE ribosomal protein motifs: none](#)

[checking 33 PROSITE prokaryotic DNA binding motifs: none](#)

[NNCN: Reinhardt's method for Cytoplasmic/Nuclear discrimination](#)

Prediction: cytoplasmic
 Reliability: 89

[COIL: Lupas's algorithm to detect coiled-coil regions](#)

total: 0 residues

Predicciones TargetP V1.0 y SignalP 3.0

(CBS Prediction Servers) (www.cbs.dtu.dk/services) (Emanuelsson *et al.*, 2000)

CAT-2

Longitud	mTP ¹	SP ²	otra loc	RC
753	0.291	0.032	0.773	3

¹Mitocondrial (*mitochondrial targeting peptide*)

²Proteína de secreción (*secretory pathway signal peptide*)

Prediction: Non-secretory protein

Signal peptide probability: 0.000

Signal anchor probability: 0.000

Predicción MitoProt II 1.0a4

(*Prediction of mitochondrial targeting sequences*) (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) (Claros y Vincens, 1996)

Valores de los parámetros computados

Net charge of query sequence: -13

Analysed region: 41

Number of basic residues in targeting sequence: 5

Number of acidic residues in targeting sequence: 2

Cleavage site: 34

Cleaved sequence: MSECPVRKSNVGGGGTRNHDWWPAQLRLNILRQ

Probabilidad de ser exportada a la mitocondria: 0.0193

La caracterización de las cepas $cat-2^{RIP(F2)}$

Para caracterizar el fenotipo de las cepas $cat-2^{RIP}$, seleccionamos al azar cepas de ambos sexos de la progenie de las mutantes $cat-2^{RIP2}$ y $cat-2^{RIP12}$. Estas cepas (cepas $cat-2^{RIP(F2)}$) fueron más sensibles al calor (por ejemplo, fueron incapaces de crecer a 42°C) y a los hidroperóxidos que la cepa silvestre y presentaron un desarrollo sexual prematuro (ver los detalles más adelante). La sensibilidad ante el calor estuvo presente en todas las cepas seleccionadas de la descendencia (F2 y F3) de las mutantes $cat-2^{RIP2}$ y $cat-2^{RIP12}$. Asimismo, cepas de ambos sexos de la progenie (F3) de los dos linajes ($cat-2^{RIP2}$ y $cat-2^{RIP12}$) presentaron el desarrollo sexual prematuro.

Se sabe que en ocasiones las mutaciones que se generan durante el proceso de RIP se extienden a regiones aledañas (de por lo menos 900 pb) a la secuencia del ADN duplicada que induce el RIP (Irelan *et al.*, 1994). Así, para demostrar que el fenotipo de las cepas $cat-2^{RIP(F2)}$ es consecuencia de la ausencia de la CAT-2, se llevaron a cabo experimentos de complementación de las cepas mutantes con el gen $cat-2$ silvestre. Para ello, se construyó el vector pCP5 que comprendió una secuencia del gen $cat-2$ que abarcó desde 900 pb arriba de la región codificante hasta la secuencia de poli-adenilación del ARNm. La integración de este vector se puede dirigir al locus $his-3$ de una cepa $his-3^{Y234M723}$ y cuando esto ocurre se complementa su auxotrofia de histidina (como se ha descrito con anterioridad). Con este vector transformamos cepas $cat-2^{RIP(F2)}$; $his-3$ y recuperamos las transformantes protótrofas de histidina. Sin embargo, no obtuvimos cepas en las que se restableciera el crecimiento a 42°C. Paralelamente, se extendió el análisis de la segregación genética de las cepas mutantes $cat-2^{RIP(F2)}$ en cruza sexuales con la cepa silvestre y se incrementó el número de cepas de la descendencia analizadas (n=40). Con este análisis encontramos que algunas cepas carentes de la CAT-2 fueron capaces de crecer a 42°C. La frecuencia de recombinación entre estas dos características fue de 12%, lo que indica que la sensibilidad al calor se debe a una mutación en un gen distinto de $cat-2$ y que éstos se localizan en el mismo cromosoma. Una de las cepas carentes de CAT-2 que fue capaz de crecer a 42°C ($cat-2^{RIP12(F4)}$) fue nuevamente cruzada por la cepa silvestre. Se observó que el 100% de su descendencia fue capaz de crecer a 42°C y el 50% careció de la actividad CAT-2. Dos de estas cepas ($cat-2^{RIP12(F5)}$) fueron caracterizadas y ambas mostraron la misma tolerancia ante los hidroperóxidos que la cepa silvestre, lo que nos indicó que tampoco la sensibilidad ante los hidroperóxidos fue consecuencia de la mutación en el gen $cat-2$. Por otra parte, también se evaluó el desarrollo sexual de estas cepas y fue

indistinguible del de las cepas silvestres. Tampoco las alteraciones del desarrollo sexual se deben a la ausencia de la CAT-2. Asimismo, encontramos una cepa que no fue sensible a la temperatura y que presentó el desarrollo sexual típico de la cepa $cat-2^{RIP12(F2)}$, lo que sugiere que estas dos características tampoco están ligadas.

A continuación se detalla el fenotipo original de las cepas $cat-2^{RIP12(F2)}$ que no fue consecuencia de la ausencia de la CAT-2:

Las cepas $cat-2^{RIP(F2)}$ son sensibles al calor

El crecimiento de las cepas $cat-2^{RIP(F2)}$ en medio MV/sacarosa-agar (1.5%) no se vio afectado por la temperatura en un intervalo de 30 – 40°C, ni se observaron diferencias con respecto al crecimiento de las cepas silvestres. Sin embargo, a 42°C, donde la cepa silvestre creció lentamente, las cepas $cat-2^{RIP(F2)}$ fueron incapaces de crecer (Fig. 33 A y B).

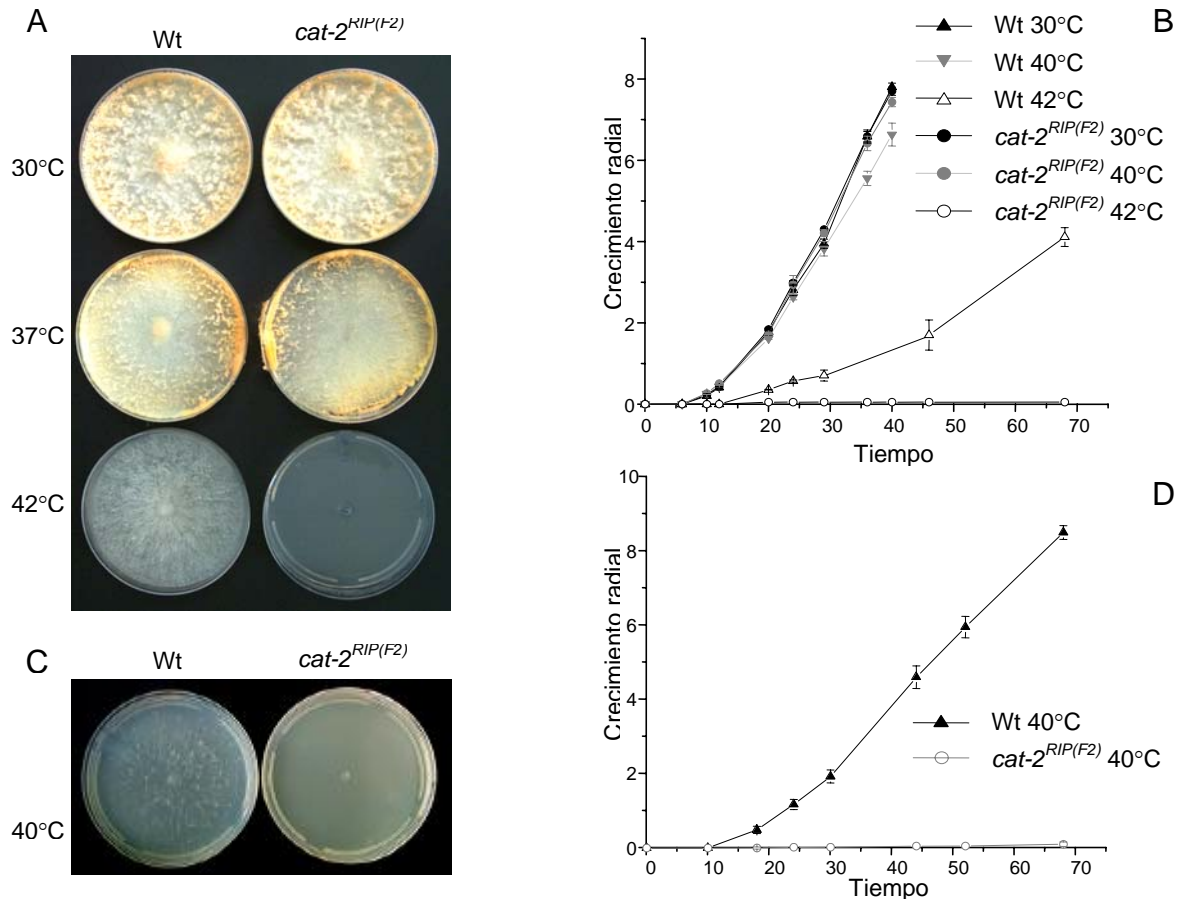


Figura 33. Crecimiento de la cepa $cat-2^{RIP(F2)}$ en diferentes temperaturas. Las cepas silvestre y $cat-2^{RIP(F2)}$ se inocularon por punto en medio MV/-agar con sacarosa al 1.5% (A y B) o glucosa al 0.05% (C y D) y se incubaron en las temperaturas indicadas. (A y C) Aspecto de los cultivos a los 3 días. (B y D) Radio de las colonias en diferentes tiempos.

El efecto de la temperatura fue irreversible ya que cuando las cajas de cultivo se trasladaron a 30°C después de ser incubadas 4 días a 42°C no se observó crecimiento de las cepas *cat-2^{RIP(F2)}*. Esto sugirió que el tratamiento a dicha temperatura resulta letal para estas cepas. Asimismo, el efecto de la temperatura se intensificó cuando la sacarosa (o la glucosa) se empleó en bajas concentraciones, entre 0.03 - 0.05% las cepas *cat-2^{RIP(F2)}* fueron incapaces de crecer incluso a 40°C (Fig. 33 C, mostrado sólo para glucosa al 0.05%).

Se evaluó el efecto de un choque térmico de 30 ó 60 minutos a una temperatura letal (48°C) o subletal (42°C) sobre los conidios germinados (6 h) y observamos que la cepa *cat-2^{RIP(F2)}* fue más sensible que la silvestre. En la figura 34 se muestra el porcentaje de supervivencia de las cepas silvestre y *cat-2^{RIP(F2)}* ante estos tratamientos. La participación del oxígeno en el efecto letal del choque térmico fue determinante ya que, cuando el experimento se llevó a cabo en tubos cerrados, no se observaron diferencias significativas en la supervivencia de las dos cepas (no se muestra).

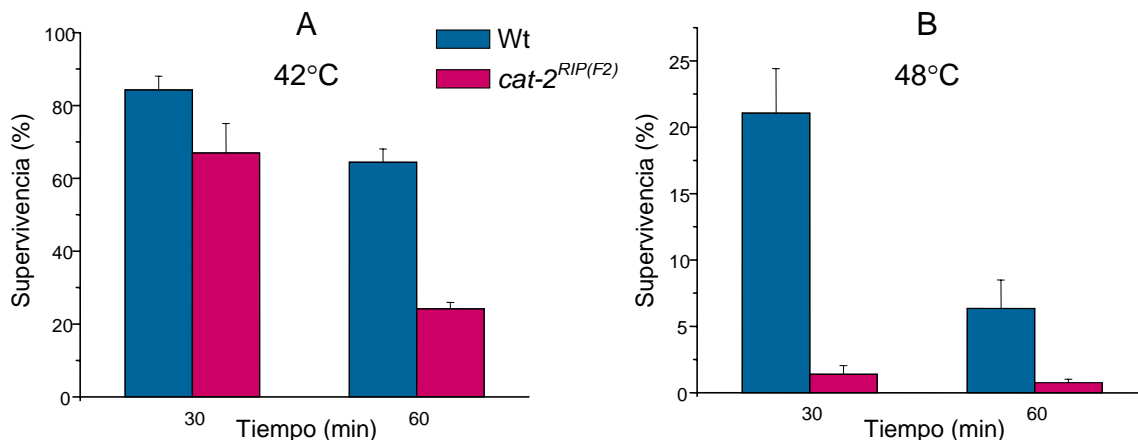


Figura 34. Sensibilidad de la cepa *cat-2^{RIP(F2)}* al choque térmico. Conidios de las cepas silvestre y *cat-2^{RIP(F2)}* fueron crecidos 6 h a 30°C, 1 ml del cultivo se transfirió a tubos de ensaye y se incubó durante 30 o 60 minutos a 42°C (A), 48°C (B) o 30°C (control). Se determinó la supervivencia de las células después de los tratamientos y se expresó en función de la de los experimentos control.

Las cepas *cat-2^{RIP(F2)}* son sensibles a los hidroperóxidos

Evaluamos la supervivencia de germínulas de 6 horas de las cepas *cat-2^{RIP(F2)}* ante diferentes concentraciones de *tert*-butil hidroperóxido y de H₂O₂. Observamos que la cepa mutante *cat-2^{RIP(F2)}* fue más sensible que la cepa silvestre tanto al tratamiento con el butilhidroperóxido como al del H₂O₂ (Fig. 36). Las diferencias en la sensibilidad de las cepas fueron particularmente evidentes en el intervalo de 5 - 50 mM para H₂O₂ (Fig. 36 A) y entre 0.5 - 1 mM para el butilhidroperóxido (Fig. 36 B).

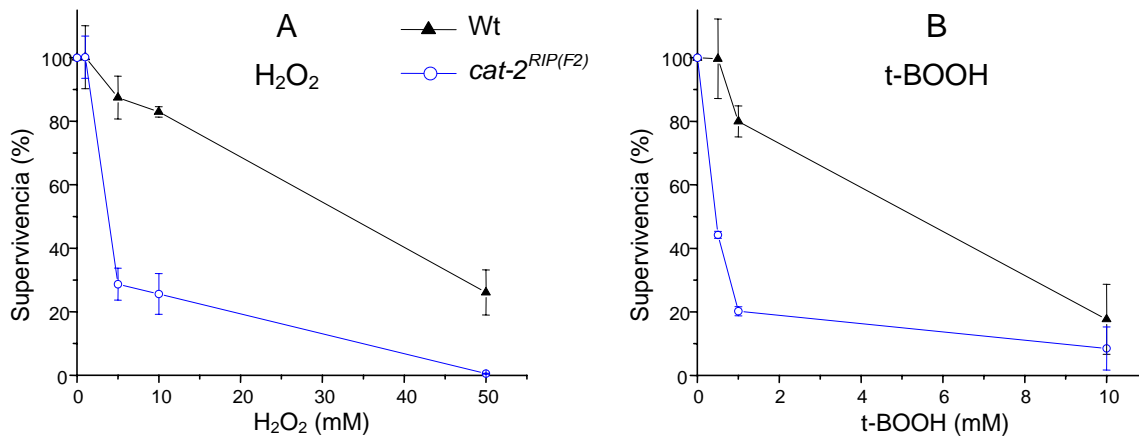


Figura 36. Sensibilidad de la cepa *cat-2^{RIP(F2)}* a los hidroperóxidos. Conidios de las cepas silvestre y *cat-2^{RIP(F2)}* fueron crecidos 6 h y 1 ml del cultivo se llevó a un volumen de 2 ml con la concentración indicada (abscisas) de H₂O₂ (A) o butilhidroperóxido (t-BOOH) (B). Se determinó la supervivencia de las células después de los tratamientos y se expresó en función de la de experimentos control (con H₂O).

La conidiación de las cepas *cat-2^{RIP(F2)}* en metanol es cíclica

La tasa de crecimiento del hongo en metanol como única fuente de carbono no se afectó en las cepas mutantes *cat-2^{RIP(F2)}* pero se observó un patrón de conidiación en bandas concéntricas característico del ciclo de conidiación y crecimiento del hongo. El periodo del ciclo fue cercano a 24 h. Para estudiar con más detalle este fenómeno, las cepas silvestre y *cat-2^{RIP(F2)}* fueron crecidas en medio MV/metanol en condiciones de oscuridad total y comparadas con la cepa *band (bd)*, que es la cepa de referencia en que se ha estudiado la conidiación circadiana (Fig. 37).

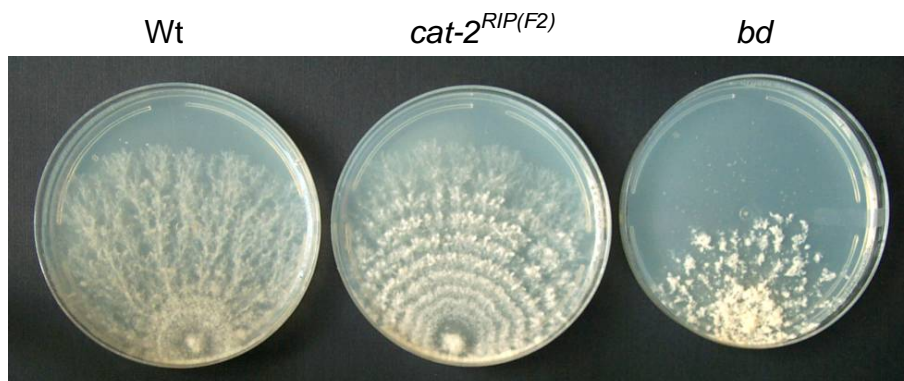


Figura 37. Crecimiento de cepas de *N. crassa* en metanol. 1000 conidios de las cepas silvestre, *cat-2^{RIP(F2)}* y *bd* se inocularon en cajas con medio MV/metanol y se incubaron a 30°C en la oscuridad (cubiertas con papel aluminio). Las cajas se fotografiaron después de 11 días.

Es interesante observar que la cepa *bd*, que habitualmente presenta un ciclo espontáneo de conidiación, en estas condiciones no mostró el patrón definido y creció escasamente. Asimismo, un ciclo de conidiación incipiente se pudo observar en la cepa silvestre. Éste fue evidente durante los primeros días del crecimiento; sin embargo, se perdió después del tercer día de crecimiento. Un fenómeno de atenuación semejante se observó en la cepa *cat-2*^{RIP(F2)} pero el ciclo fue más sostenido y duró por lo menos 9 días.

La formación de peritecios durante el desarrollo sexual de las cepas *cat-2*^{RIP(F2)}

También se encontraron diferencias en el desarrollo sexual de las cepas *cat-2*^{RIP(F2)}. Estas cepas fueron fértiles en ambos sexos, como receptoras (femeninas) y donadoras (masculinas) y tanto en cruza homóciga y como heteróciga. La morfología de sus peritecios y ascosporas fue normal y las esporas fueron viables y germinaron con la misma frecuencia que las silvestres. Sin embargo, cuando las cepas *cat-2*^{RIP(F2)} fungieron como receptoras, el proceso de formación de los peritecios ocurrió de manera prematura y en mayor cantidad.

Para estudiar el proceso de reproducción sexual se inocularon cajas con medio SC con 1000 conidios de la cepa receptora. Los conidios fueron plaqueados para obtener cultivos a confluencia o se inocularon por punto en el centro de las cajas para evaluar el desarrollo en colonias concéntricas. Las colonias fueron fertilizadas después de 6 días de crecimiento con gotas de 10 µl de una suspensión conidial (del sexo opuesto). Se determinó el número de peritecios que emergió de cada área fertilizada en el transcurso de los siguientes 8 días. Así, 24 h después de la fertilización, se observaron numerosos primordios de peritecios anaranjados en las zonas fertilizadas de la cepa *cat-2*^{RIP(F2)}, mientras que en las cepas silvestres éstos fueron escasos y generalmente de menor tamaño (Fig. 38 A y C). El proceso de formación de los peritecios no sólo fue prematuro, sino que el número de las estructuras sexuales formadas fue mayor para las cepas *cat-2*^{RIP(F2)} a lo largo de todo el proceso. Al cabo de 8 días, la cepa mutante formó alrededor de 6 veces más peritecios que las silvestres (Fig. 38 B y D). El número de peritecios formados durante el desarrollo sexual se muestra en la figura 38 E. Este fenómeno se observó siempre que una cepa *cat-2*^{RIP(F2)} actuó como receptora, no importando su sexo ni si la cruza fue homóciga o heteróciga (Fig. 38 E, mostrado sólo para las cepas *mat-a* como receptoras).

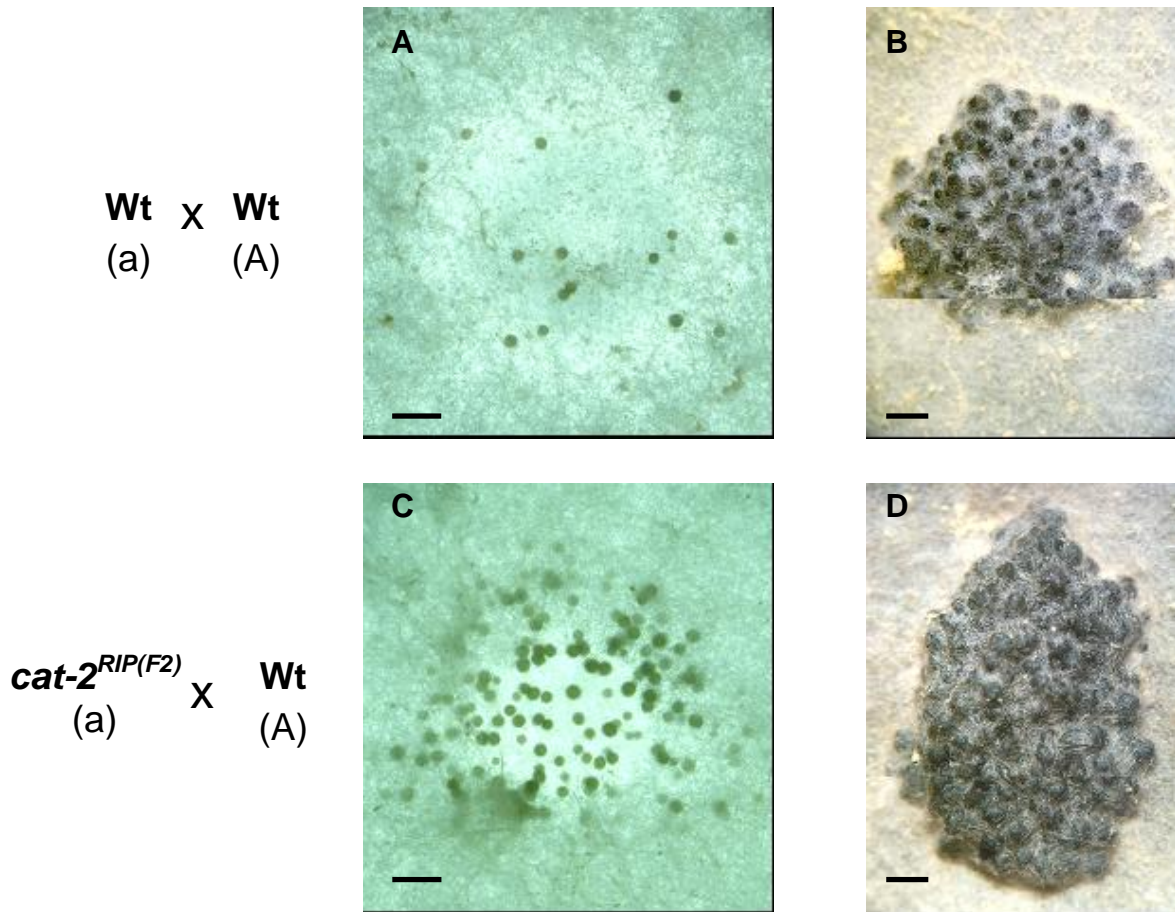
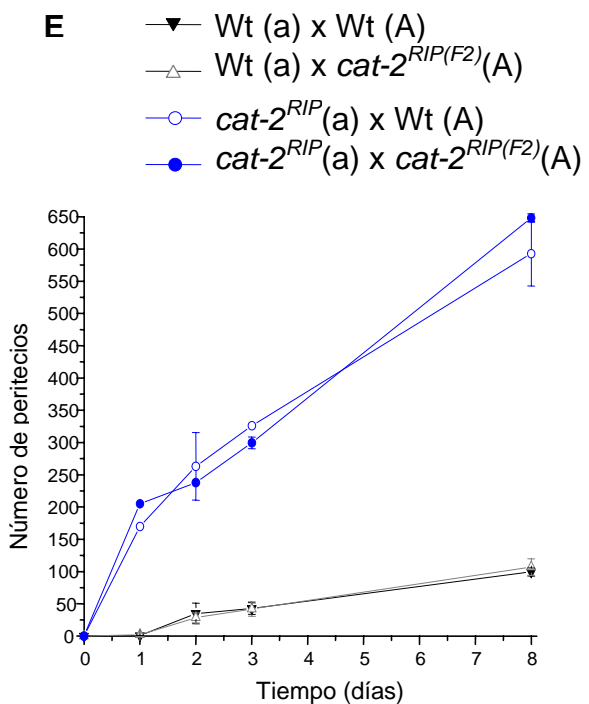


Figura 38. La formación de peritecios en la cepa *cat-2*^{RIP(F2)}. Las cepas silvestre y *cat-2*^{RIP(F2)} fueron sembradas en placas con medio SC y después de 6 días de crecimiento a 25°C fueron fertilizadas con 5000 conidios de una cepa silvestre del sexo opuesto. Las áreas fertilizadas se fotografiaron después de 1 día (A y C) y de 8 días (B y D). Las imágenes se capturaron con un microscopio estereoscópico y tienen el mismo aumento, barra = 1 mm. E) Cuantificación de los cuerpos fructíferos formados (por área fertilizada) a lo largo del desarrollo sexual en cruza homocigas y heterocigas entre las cepas Wt y *cat-2*^{RIP(F2)}.



Por otra parte, evaluamos la formación de los peritecios en diferentes regiones de colonias concéntricas del hongo. Los cultivos inoculados por punto fueron fertilizados mediante una suspensión de conidios que cubrió de forma homogénea la superficie de las cajas y después de 1 semana se determinó el número de peritecios formados a diferentes distancias del centro de la colonia (en un radio de 1, 2 y 3 cm). Las diferencias en el número de peritecios que formó una cepa mutante *cat-2*^{RIP(F2)} con respecto a la silvestre fueron evidentes en el centro (en la parte más vieja) de las colonias y dentro de un radio de 1 cm; sin embargo, conforme nos acercamos a la periferia de las colonias, las diferencias fueron menos evidentes (en un radio de 2 cm) o incluso desaparecieron (más allá de 3 cm) (Fig. 39 A, B y C). Para corroborar nuestros resultados analizamos este desarrollo a lo largo del tiempo. Las diferencias en el número de peritecios de la parte central de la colonia se observaron a lo largo de todo el proceso; en donde, en términos generales, la cepa *cat-2*^{RIP(F2)} formó nuevamente cerca de 6 veces más peritecios que la silvestre (Fig. 39 D). La formación de peritecios en al región periférica de las colonias fue semejante para ambas cepas a lo largo del proceso (Fig. 39 E).

Para determinar si esta formación de peritecios prematura es consecuencia de un desarrollo de protoperitecios precoz o de un desarrollo post-fertilización más rápido, evaluamos la formación de protoperitecios antes de la fertilización. Observamos que la formación de protoperitecios ocurre antes en las cepas *cat-2*^{RIP(F2)}. De hecho, en estas cepas fue posible distinguir protoperitecios después de 5 días de la inoculación (Fig. 40 C), mientras que en las silvestres no aparecieron hasta el sexto día (Fig. 40 B).

Asimismo, evaluamos la formación de protoperitecios en diferentes regiones de la colonias. Para ello se determinó el número de protoperitecios formados a diferentes distancias del radio de colonias inoculadas por punto. Al igual que con los peritecios, las diferencias en el número de protoperitecios que forma una cepa mutante *cat-2*^{RIP(F2)} con respecto a la silvestre, fueron evidentes en el centro de las colonias (Fig. 40 A, C y E); sin embargo, éstas se atenuaron y desaparecieron conforme nos acercamos a la periferia de las colonias (Fig. 40 B, D y E).

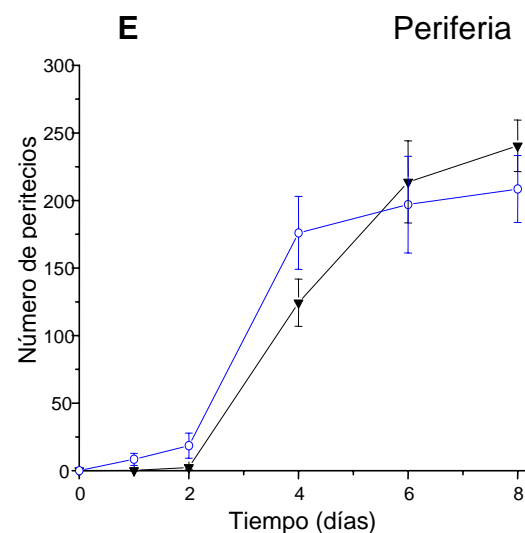
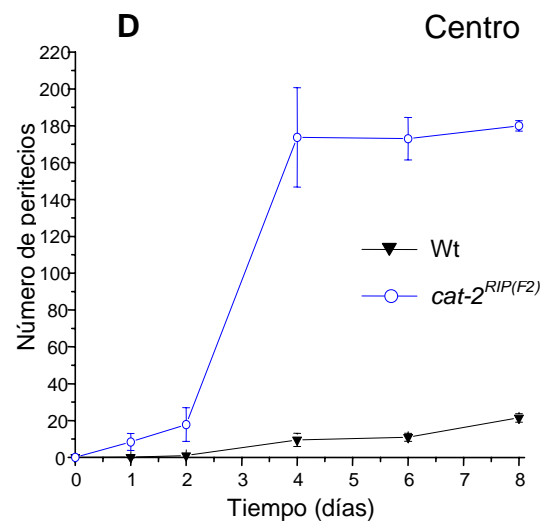
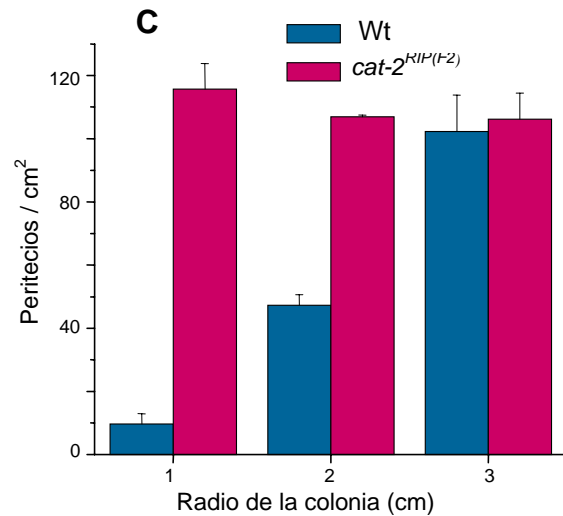
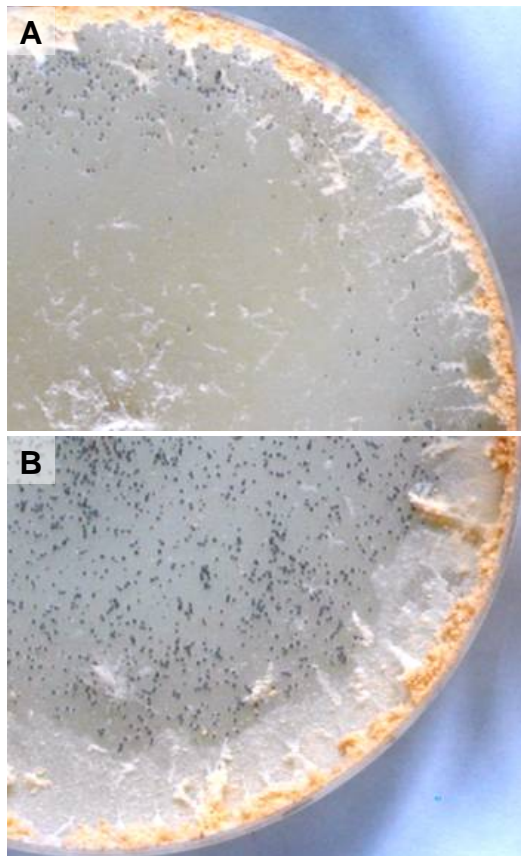


Figura 39. La formación de peritecios en la cepa *cat-2*^{RIP(F2)}. Las cepas silvestre (A) y *cat-2*^{RIP(F2)} (B) fueron inoculadas por punto en medio SC y después de 6 días se fertilizaron con el mismo número de conidios. (C) Número de peritecios formados a los 8 días en un radio de 1, 2 y 3 cm (a partir del centro de la colonia). Por otra parte, las regiones del centro (≤ 1 cm) (D) y de la periferia (3 cm) (E) de la colonias se fertilizaron con 10 μ l de una suspensión de conidios y se contaron los peritecios formados (por área fertilizada) a lo largo del desarrollo sexual. Sólo se indica el sexo de la cepa receptora. Todas las cruces se realizaron con las cepas (*matA*) como receptoras y se fertilizaron por una cepa silvestre.

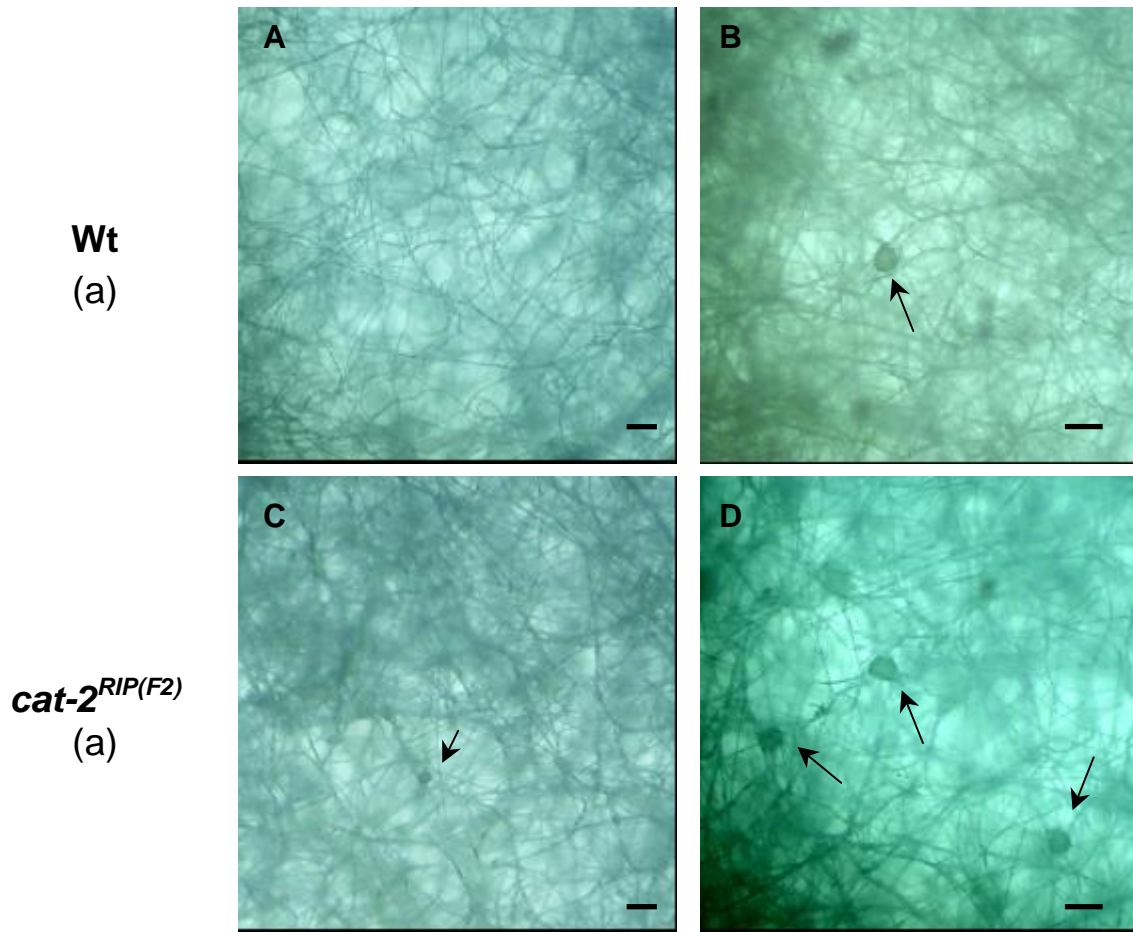
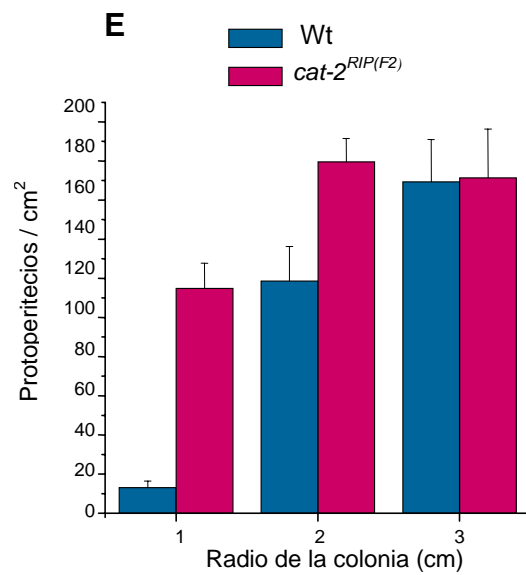


Figura 40. La formación de protoperitecios en la cepa *cat-2^{RIP(F2)}*. Las cepas silvestre (A y B) y *cat-2^{RIP(F2)}* (C y D) fueron inoculadas por punto en medio SC y áreas de la colonia a diferentes distancias del centro fueron analizadas bajo el microscopio estereoscópico. (A-D) Imágenes que muestran los protoperitecios formados después de 5 (A y C) y 6 días (B y D) en el centro de las colonias (en un radio de 1 cm). Barra = 0.1 mm. (E) Cuantificación de los protoperitecios en función del radio de la colonia (a partir del centro de la colonia).



Minireview

***Neurospora crassa* Catalases, Singlet Oxygen and Cell Differentiation**

Leonardo Peraza and Wilhelm Hansberg*

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F. México

* Corresponding author

The morphogenetic transitions of the *N. crassa* asexual life cycle are responses to a hyperoxidant state in which probably singlet oxygen is generated. Induction of catalase activity and catalase oxidation by singlet oxygen are consequences of this recurrent hyperoxidant state. Here the biochemical properties and regulation of two large monofunctional catalases are reviewed, and a new catalase-peroxidase gene and activity is described. Catalase-3 is associated to growing and Catalase-1 to non-growing cells. Under stressful conditions one of these catalases is synthesized, depending on whether growth can be continued or a resistant cell has to be made. The catalase-peroxidase Catalase-2 was possibly derived from a bacterial enzyme. In contrast to the other catalases, Catalase-2 had catalase and peroxidase activity. Catalase-2 was expressed under conditions in which vacuolization of hyphae is observed. All three enzymes have a chlorin in its active site instead of ferroprothemo IX and are resistant to molar concentrations of hydrogen peroxide. These and all other catalases tested so far are oxidized by singlet oxygen, probably at the heme moiety. The catalase activity is virtually unaffected by oxidation, but the enzymes are probably degraded more rapidly than the unmodified ones.

Key words: Chlorin/Fungal catalase-peroxidase/Heme oxidation/Hyperoxidant state/Reactive oxygen species.

Introduction: Cell Differentiation and Reactive Oxygen Species

The ascomycete *Neurospora crassa* has a sexual and an asexual life cycle. Large mononucleated dark-brown spores, called ascospores, are produced in the sexual cycle; small multinucleated orange spores, called conidia, are produced in the asexual cycle. We have used the asexual life cycle as a model to study cell differentiation.

Our experimental system is simple: growing hyphae in a liquid medium are filtered and the resulting mycelial mat is exposed directly to the air. This starts a synchronous process of conidiation. Initially, hyphae in direct contact with air adhere to each other in 40 min. Aerial hyphae initials are subsequently formed from adhering hyphae after 2 h of air exposure. Aerial hyphae grow and start forming conidia at 8–9 h after air exposure. Thus, to form conidia from growing hyphae, three morphogenetic transitions take place: from (1) growing hyphae to adhering hyphae, (2) adhered hyphae to aerial hyphae, and (3) aerial hyphae to conidia (Toledo *et al.*, 1986). Any of the differentiated cell structures can revert to growing hyphae when placed in a nutrient medium.

At the start of each morphogenetic transition we have detected a hyperoxidant state. A hyperoxidant state is defined as an unstable, transient state in which reactive oxygen species surpass the antioxidant capacity of the cell (Hansberg and Aguirre, 1990; Hansberg, 1996). Experimental data indicating the development of a hyperoxidant state are: specific oxidation of some enzymes (Toledo *et al.*, 1994), massive total protein oxidation and degradation (Toledo and Hansberg, 1990), loss of NAD(P)H reducing power, glutathione oxidation and glutathione disulfide excretion (Toledo *et al.*, 1991, 1995), oxygen-dependent chemiluminescence, inhibition of chemiluminescence and cell differentiation by antioxidants (Hansberg *et al.*, 1993), induction of antioxidant enzymes (Hansberg, 1996), and increase of carotenes and other antioxidant mechanisms.

Superoxide is inevitably formed in cells mainly from electron leakage from the respiratory chain, but also by various oxidases, most importantly NAD(P)H oxidases and xanthine oxidase. Superoxide is dismutated by SOD to form hydrogen peroxide (H_2O_2) and dioxygen. Because superoxide does not easily cross cellular membranes, there is a mitochondrial, a cytosolic and, in many organisms, an extracellular SOD. Contrary to what is often believed, superoxide is not a very reactive compound, moreover it dismutates spontaneously. H_2O_2 is dismutated by catalase to form two water molecules and dioxygen. Besides catalase, catalase-peroxidases, peroxidases and peroxiredoxines contribute to the disposition of H_2O_2 . Because H_2O_2 does not react readily, it can diffuse through the cytoplasm and into different cellular compartments. If superoxide and H_2O_2 are not very reactive compounds, why are there so many enzymes to dispose of them?

In the presence of SOD and catalase, the superoxide and H_2O_2 formed are converted quantitatively into water and dioxygen. However, if superoxide and/or H_2O_2 detoxification is deficient, hydroxyl radical and singlet oxygen (1O_2) are formed, which are the most reactive oxygen species. Thus, the probable function of SOD and H_2O_2 disposing enzymes is not to eliminate these oxygen species but to prevent formation of hydroxyl radicals and 1O_2 . The importance of the hydroxyl radical in oxidative stress is well documented (Halliwell and Gutteridge, 1989). It is usually related to free metal ions, such as Fe(II), that loosely bind to proteins and nucleic acids where they can participate in a Fenton reaction. However, 1O_2 also seems to have a role in oxidative stress.

Singlet Oxygen

A short review on 1O_2 and its effects on cells has been published recently (Lledías and Hansberg, 2000). The main reactions that can generate 1O_2 are: (i) spontaneous dismutation of superoxide, (ii) reaction of H_2O_2 with superoxide, catalyzed by traces of transition metal ions, (iii) the decomposition of H_2O_2 by many compounds, such as hypochloride, and (iv) the decomposition of hypochloride itself. In addition, radiation absorbance of colored compounds that can transfer electron excitation to dioxygen is also a main source of 1O_2 . Cells have many photoactive compounds: flavins, porphyrins, bilirubin, quinones, retinal, NAD(P)H, and chlorophylls in plants. Besides producing 1O_2 , excited colored compounds are prone to reduction and generation of superoxide or other radicals.

The half-life of 1O_2 varies according to the medium. In air (90 μ s) it is much longer than in water (3 μ s). It is even shorter inside cells (0.5 μ s), where it reacts rapidly with many different compounds. In deuterated water the half-life of 1O_2 increases to 68 μ s. Even though it has a short life, 1O_2 generated inside cells can have important effects on gene transcription and metabolic regulation. 1O_2 can react with nucleic acids, producing mainly guanidine adducts that can be detected as 8-hydroxydeoxyguanosine in a DNA hydrolysate. 1O_2 reacts particularly with His, Trp, Met, and Tyr radicals of proteins. These amino acids are good scavengers of 1O_2 . It also forms lipid peroxides with unsaturated lipids. The best quenchers for 1O_2 are carotenes and tocopherols. The excited state of 1O_2 is transferred to these compounds and energy is then dissipated to the solvent.

Catalases and Cell Differentiation

It has been shown that total protein and specific enzymes are oxidized during the morphogenetic transitions of the conidiation process (Toledo and Hansberg, 1990; Toledo *et al.*, 1994). Glutamine synthetase is specifically oxidized in its active site by the *in situ* formation of a hydroxyl radical (Aguirre and Hansberg, 1986). NADPH-depend-

ent glutamate dehydrogenase is specifically oxidized when a ferric ion on a dicarboxylic acid ligand of the allosteric site (Aguirre *et al.*, 1988) generates a hydroxyl radical with H_2O_2 . Both enzymes are inactivated and degraded more rapidly than the unmodified enzymes. From these results, we asked if enzymes responsible for the removal of reactive oxygen species are also oxidized by reactive oxygen species. We have found that catalase is specifically oxidized by 1O_2 (Lledías *et al.*, 1998).

One of the main antioxidant enzymes is catalase, which dismutates H_2O_2 into two water molecules and O_2 . Although catalases have been studied for decades, there are many interesting still unsolved questions regarding catalase function and structure (Zámocky and Koller, 1999; Díaz *et al.*, 2001).

N. crassa has two large (=80 kDa monomers) catalases: Cat-1, mainly in conidia, and Cat-3, in mycelia (Chary and Natvig, 1989; S. Michán, F. Lledías, J.D. Baldwin, D.O. Natvig, and W. Hansberg, submitted). The two genes were cloned, sequenced and the corresponding catalase activities were characterized (S. Michán, F. Lledías, J.D. Baldwin, D.O. Natvig, and W. Hansberg, submitted). Both genes belong to a family of catalases from bacteria and fungi that have a flavodoxin-like domain at their C-terminus (Bravo *et al.*, 1997; Klotz *et al.*, 1997). The amino acid sequence of the Cat-3 N-terminus indicates that this catalase is processed and excreted (S. Michán, F. Lledías, J.D. Baldwin, D.O. Natvig, and W. Hansberg, submitted). Homologs of Cat-3 in other fungi also have a signal peptide and the enzyme is processed and secreted (Calera *et al.*, 1997; Garre *et al.*, 1998).

Cat-1 and Cat-3 catalases are present throughout the *N. crassa* asexual life cycle, however, they are expressed differentially (Chary and Natvig, 1989; S. Michán, F. Lledías, J.D. Baldwin, D.O. Natvig, and W. Hansberg, submitted). A large increase in catalase activity accompanied the appearance of each differentiated cell structure during the conidiation process. This is considered a consequence of the recurrent hyperoxidant state during the conidiation process. The largest increase in *cat-1* mRNA and Cat-1 activity takes place during the formation of conidia. Cat-1 constitutes 0.6% of total protein in conidia (Díaz *et al.*, 2001) and accounts for most of the catalase activity during germination and initiation of growth. CatA, the *Aspergillus nidulans* Cat-1 homologous catalase, is also accumulated in conidia, and conidia from a CatA null-mutant strain are sensitive to H_2O_2 (Navarro *et al.*, 1996). This highlights the importance of these catalases for germination under natural conditions, where substrates such as plant material can generate considerable amounts of H_2O_2 through the NADPH oxidase.

cat-3 mRNA accumulates during the phase of late exponential growth and in mycelia subject to stress conditions, such as treatment with H_2O_2 , paraquat, cadmium ions, heat shock, and uric acid or NO_3 as sole nitrogen source (S. Michán, F. Lledías, J.D. Baldwin, D.O. Natvig,

and W. Hansberg, submitted). Nitrate has been shown to induce a *N. crassa* catalase (Jacob, and Orme-Johnson, 1979a). *cat-1* mRNA accumulates in the pre-stationary growth phase, when nutrients in the medium are depleted, or with ethanol as the sole carbon source (S. Michán, F. Lledías, J.D. Baldwin, D.O. Natvig, and W. Hansberg, submitted). Thus, both genes are differentially regulated during the asexual life-cycle and in response to stress. Cat-3 activity generally increases when cells respond to stress conditions that can be compensated rapidly to

continue growth; Cat-1 activity augments when cells respond to stress that impairs growth and a resistant cell, such as arthrospores or conidia, has to be made.

Catatase-2, a Fungal Catalase-Peroxidase

A cDNA was isolated using 3' RACE and oligonucleotides based on a partial cDNA sequence (NCM10B4T3) deposited in the GenBank database (BF739529). The amino

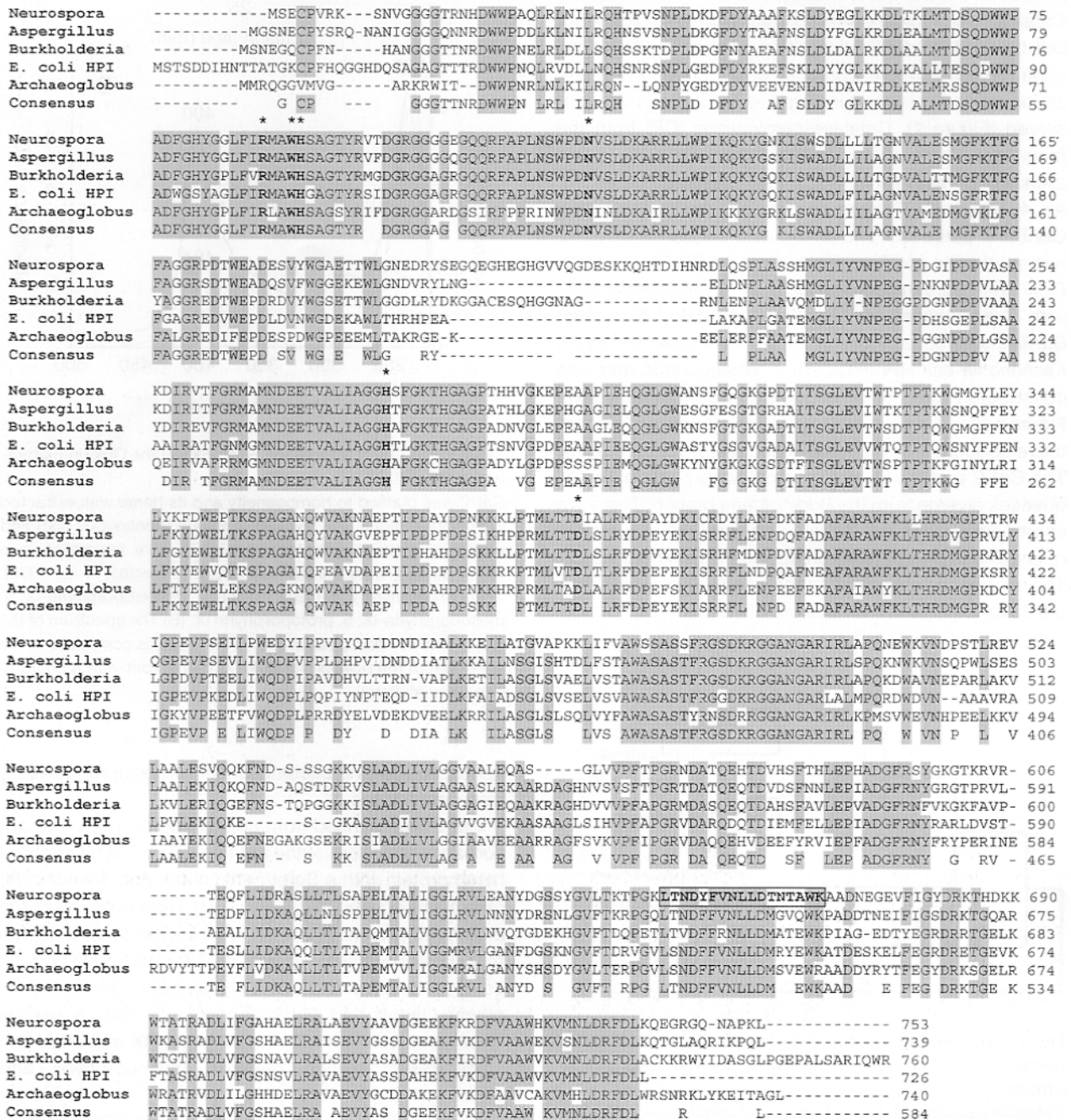


Fig. 1 Comparison of *cat-2* with an *A. nidulans*, Bacterial and Achaean Catalase-Peroxidases. Cat-2 from *N. crassa* was aligned with catalase-peroxidases from *A. nidulans* (CAC59821), *Burkholderia cepacia* (AAG60688), *E. coli* (AAA24040) and *Archaeoglobus fulgidus* (O28050). Sequence alignment of catalase-peroxidases was performed using the Clustal W algorithm and refined by eye. The internal peptide sequence found from Cat-2 is boxed. The asterisks indicate functionally important amino acids.

acid sequence of an internal Catalase-2 peptide was in the predicted sequence of this cDNA, demonstrating that *cat-2* encodes Catalase-2 (Cat-2). The Cat-2 genomic sequence was obtained from the Neurospora Sequencing Project (Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research; www.genome.wi.mit.edu). It is in the contig 2.407 and the nearest marker is *poi-2* of chromosome VII. The comparison between the two sequences revealed an open reading frame with no introns, which encodes a 753 amino acid protein that corresponds to a typical catalase-peroxidase (Figure 1). The *cat-2* sequence was deposited in GenBank under accession number AF459787. Catalase-peroxidases evolved in a prokaryotic progenitor cell by tandem duplication of an ancestral peroxidase gene (Welinder, 1991; Zámocky *et al.*, 2000). Important amino acids for heme binding and for activity are conserved (Figure 1). Catalase-peroxidases (CP) from the fungi *Septoria tritici* (Levy *et al.*, 1992) and *Penicillium simplicissimum* (Fraaije *et al.*, 1996) have been characterized. An *A. nidulans* CP gene-sequence is deposited in the GenBank database. The amino acid sequence of Cat-2 has an identity of 67% with *A. nidulans* CP (CAC59821), 62% with *Burkholderia cepacia* CP (AAG60688), 59% with *Streptomyces reticuli* CP (CAA74698), 57% with *Bacillus stearothermophilus* CP (P14412), and 55% with *Escherichia coli* HPI (P13029). A phylogenetic tree was constructed with 30 CP sequences from different taxa. Figure 2 shows a phylogenetic tree made with a representative sequence of the main branches of the first three. The Cat-2 and the *A. nidulans* catalase-peroxidase sequences diverge from the *Burkholderia* branch. There is a short sequence in *cat-2* that is not present in most sequences and only partially present in the *Burkholderia* CP. The sequence similarity with the bacterial enzymes (Figure 2), together with the absence of introns in both fungal

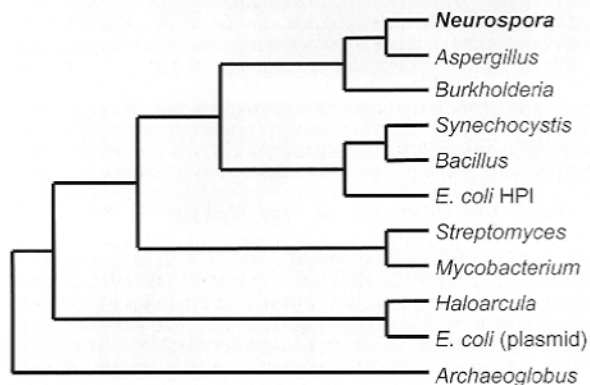


Fig. 2 Unrooted Phylogenetic Tree of Catalase-Peroxidases Based on Amino acid Sequences Generated by Maximum Parsimony.

Catalase-peroxidases from 30 taxa were aligned using the Protein Parsimony algorithm of the PHYLIP package and a most-parsimonious tree was generated. Then, representative taxa from this tree were realigned and using the Exhaustive Maximum Parsimony Algorithm in PAUP 3.0s (Swofford, 1993) the most-parsimonious tree was found.

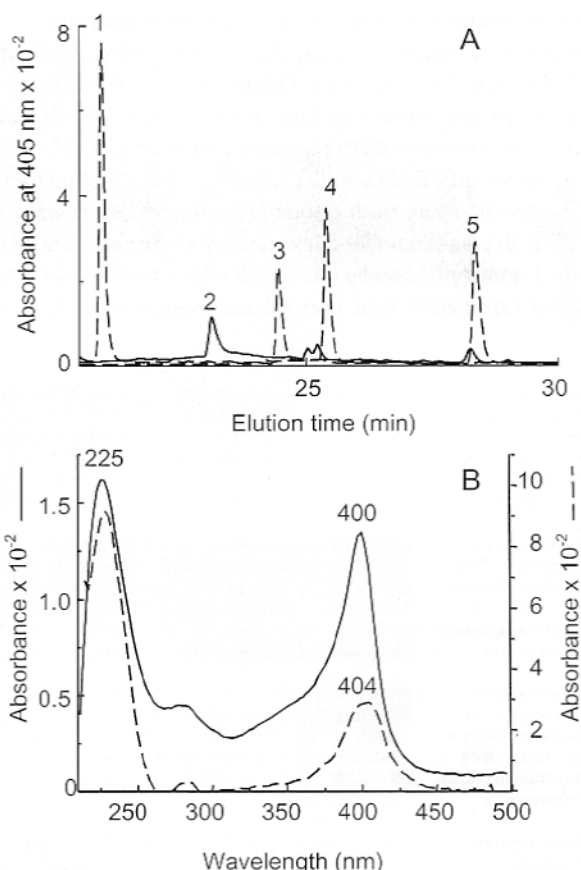


Fig. 3 HPLC and Absorption Spectrum of the Chlorin Extracted from Cat-2.

Cat-2 was purified to homogeneity and its heme was extracted with acid acetone. (A) The Cat-2 chlorin (continuous line) and porphyrin markers (discontinuous line) were separated in a HPLC using a water/acetonitrile gradient (Lledías, *et al.*, 1998). 1, coproporphyrin I; 2, Cat-2 chlorin; 3, deuteroporphyrin-IX; 4, mesoporphyrin-IX; 5, protoporphyrin IX. (B) The spectrum of the Cat-2 chlorin (main peak in the HPLC trace) is compared to the spectrum of the pure protoheme IX, carried out with a photodiode array (Waters).

genes, suggests a bacterial origin for these fungal catalase-peroxidases.

Cat-2 was purified from conidiating cultures. The absorbance spectrum of the purified enzyme is typical for a heme protein with a Soret peak at 405 nm. The 405/280 ratio of the purified Cat-2 was 0.45. HPLC analysis of the prosthetic groups indicated a less hydrophobic chlorin than protoporphyrin IX (Figure 3A). Hydrophobicity is consistent with a two hydroxyl/two carboxylic acid porphyrin (Jacob and Orme-Johnson, 1979b). A relative small peak eluting with protoporphyrin IX and other two small peaks eluting between mesoporphyrin and deuteroporphyrin were also observed.

The spectrum of the main peak in the HPLC trace of the isolated Cat-2 chlorin is compared to the spectrum of the pure protoheme IX. The Cat-2 chlorin spectrum had maxima at 225 and 400 nm and differs from the protoporphyrin IX spectrum that has a small maximum at

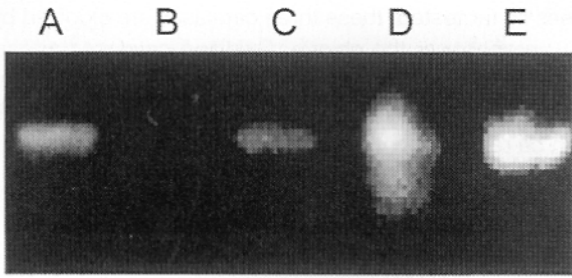


Fig. 4 Cat-2 Activity During the *N. crassa* Asexual Life Cycle. Cell extracts (150 μg protein) from different cells of the asexual life cycle were analyzed by PAGE and zymogram of the gel (Lledías *et al.*, 1998). Only Cat-2 activity is shown. (A) Stationary growth phase; (B) exponential growth phase; (C) adhered hyphae; (D) aerial hyphae, and (E) conidia.

404 nm (Figure 3B). Cat-2 chlorin and deuteroporphyrin have an absorbance maximum at 400 nm but differed in the first peak (not shown).

Purified Cat-2 has catalase and peroxidase activities. Catalase activity was resistant to molar concentrations of H_2O_2 . The Michaelis-Menten kinetics gave an apparent K_m of 13.0 ± 2.7 mM and an apparent V_{max} of 45.6 ± 1.9 U/ μg . The calculated k_{cat} was $1.27 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ and the k_{cat}/K_m $1.06 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The peroxidase activity of Cat-2 was 1.6 ± 0.1 U/ μg with *o*-dianisidine (1 mM), 1.3 ± 0.4 U/ μg with guaiacol (1 mM), 0.47 ± 0.07 U/ μg with ascorbate (0.5 mM), and 0.13 ± 0.01 with 3,3'-diaminobenzidine (1 mM). Cat-2 did not accept NAD(P)H, glutathione or cytochrome *c* as substrates. The optimal pH for the catalase activity was 6.25 and 4.75 for the peroxidase activity measured with *o*-dianisidine. Catalase activity was inhibited by KCN with an I_{50} of 14.6 μM and peroxidase activity with an I_{50} of 168.4 μM . Inactivation of Cat-2 by 3-amino-1,2,4-triazole was slow, 50% in one hour. A monofunctional catalase like Cat-1 is completely inactivated under these conditions (Díaz *et al.*, 2001).

In vivo conditions in which Cat-2 activity was observed are shown in Figure 4. No activity could be detected during exponential growth in minimal medium, but Cat-2 was present in the late stationary growth phase when there is extensive hyphae vacuolization. Cat-2 activity is induced in aerial hyphae when conidia are formed. This occurs after Cat-3 induction and before induction of the spore-specific Cat-1. At these moments the bases of aerial mycelium are lysed. Thus, Cat-2 appears under conditions in which hyphae show increased vacuolization, a sign of autolysis. Some Cat-2 was also present in conidia.

Catalases and Singlet Oxygen

Cat-1 was purified from aerial hyphae and conidia, cell structures in which this catalase is accumulated. Cat-1 is a very stable enzyme, even more than *Escherichia coli* HP11 (Switala *et al.*, 1999). It can be stored for months

without losing its activity. After boiling the enzyme for 70 min it only loses half of its activity. Likewise, the enzyme resists a high concentration of denaturing agents, such as urea and guanidine-HCl (Díaz *et al.*, 2001). However, during storage in the cold, we observed a shift in the electrophoretic mobility of the purified catalase, indicating a gain of negative charges, albeit no change in molecular weight was observed (Lledías *et al.*, 1998). When stored under Ar, the shift was retarded or impaired. Hydroxyl radicals, produced by the Fenton reaction, inactivated the enzyme but did not change its electrophoretic mobility. Superoxide produced by photosensitization of riboflavin in the presence of a reducing agent had no effect. However, the electrophoretic shift was produced by photosensitization in the absence of reducing agent, indicating participation of $^1\text{O}_2$. Light *per se* did not produce any change and the presence of SOD did not impair this modification. In contrast, different $^1\text{O}_2$ scavengers such as His, Trp, Tyr, and 3-amino-salicylic acid impaired the electrophoretic shift. In a system in which only $^1\text{O}_2$ was the oxidizing agent, the different photosensitizers induced the shift of electrophoretic mobility; this depended on the wavelength of the light source (Lledías *et al.*, 1998; Lledías and Hansberg, 2000).

Oxidation of Cat-1 by $^1\text{O}_2$ gave rise to different conformers: Cat-1a is the non-modified conformer, Cat-1e is the fully modified one, and Cat-1b, 1c and 1d are partially modified conformers (Lledías *et al.*, 1998). Cat-1c coincided in electrophoretic mobility with Cat-3, but both enzymes could be distinguished by two-dimensional gel electrophoresis. In fact, the existence of Cat-3 was discovered when we made a 2D-PAGE of a cell extract from a mutant strain with low activity of Cat-1 and increased activity of Cat-3. Antibodies against Cat-1 recognize only the Cat-1 conformers, but not Cat-3 or Cat-2; antibodies against Cat-3 or Cat-2 were specific for each enzyme and did not recognize Cat-1 (Montes de Oca, 1999).

To ascertain the site of modification in the enzyme, the chlorin from Cat-1a, Cat-1c and Cat-1e conformers were extracted and analyzed. No changes in the polypeptides after heme extraction could be detected. In contrast, different chlorins were separated by HPLC, consistent with a three-step modification of the chlorin (Lledías, *et al.*, 1998). Hexa-coordination of the Cat-1 chlorin with imidazole or cyanide shifts the Soret peak of Cat-1a from 369 nm to 408 nm, and causes a decrease in its absorbance, indicating a low spin asymmetric chlorin. The chlorin becomes more asymmetric after modification (Lledías *et al.*, 1998).

Purified Cat-2, Cat-3 or catalases from other organisms are also oxidized by $^1\text{O}_2$ (Lledías *et al.*, 1998; S. Michán, F. Lledías, J.D. Baldwin, D.O. Natvig, and W. Hansberg, submitted). *A. nidulans* CatB, *Saccharomyces cerevisiae* catalase-T, *E. coli* HP11, *Streptomyces coelicolor* catalase, human and bovine catalase, sunflower and maize catalase exhibit a shift in electrophoretic mobility when exposed to a photosensitization reaction. $^1\text{O}_2$ quenchers, such as His or 3-amino-salicylic acid, prevent

this. The shift in electrophoretic mobility observed in Cat-2 and Cat-3 is much smaller than in Cat-1. The reason for this difference is not known. Modification by dioxygen could explain some changes in other catalases and hemoproteins. This could be the case of the heme *d* formed in *E. coli* HP11 and in a *Penicillium vitale* catalase (Loewen *et al.*, 1993; Murshudov *et al.*, 1996), or the methionine sulfone generated in *Proteus mirabilis* catalase (Buzy *et al.*, 1995).

Cat-1 was modified *in vivo* during conidiation and germination. Cat-2 modification was observed in the aerial hyphae (Figure 4D). Total protein oxidation and Cat-1 modification in illuminated conidia increased within minutes of germination and was proportional to the intensity of light. In germinating conidia of carotene mutant strains, Cat-1 was modified in proportion to the carotene content, and the number of coordinated double bonds in the carotenes present (Lledías *et al.*, 1999). Cat-1 was also modified in growing wild-type mycelium treated with paraquat, and both Cat-1 and Cat-3 were modified by heat-shock. This *in vivo* modification of Cat-1 and Cat-3 was dependent on the presence of O₂ (S. Michán, F. Lledías, J.D. Baldwin, D.O. Natvig, and W. Hansberg, submitted). Because ¹O₂ is the only species that induces this modification, ¹O₂ is probably formed in cells that are either illuminated or treated with paraquat or heat shock.

Modified Cat-1 and Cat-3 are degraded more rapidly than the non-modified enzymes. Catalases are usually stable enzymes; however, under stress conditions in which catalases are oxidized, such as during germination and conidiation, paraquat or heat shock treatment, modified catalases disappear within a few hours. At the same time synthesis of one of the two catalases occurs. Thus turnover of catalases is increased during stress conditions (Lledías *et al.*, 1999). The half-lives of the different enzyme conformers is currently being investigated.

Under extreme conditions, the fully oxidized *N. crassa* Cat-1e was less stable than the non-oxidized Cat-1a, suggesting a structural change in the oxidized enzyme. However, no gross structural changes were detected by fluorescence emission spectra or by circular dichroism. In contrast, the fluorescence emission spectra of the chlorin indicated changes derived from oxidation. Cat-1a and Cat-1e gave similar kinetic constants with 100 mM H₂O₂ and behaved similarly in the presence of some inhibitors. However, kinetic differences between enzyme conformers became apparent at molar concentrations of H₂O₂, or in the presence of KCN (A. Díaz, P. Rangel, M. Rivera and W. Hansberg, unpublished).

In conclusion, morphogenetic transitions in the asexual life cycle of *N. crassa* involve a hyperoxidant state in which ¹O₂ is apparently generated. The fungus has four catalase activities, three of which have been studied, two large monofunctional catalases and the catalase-peroxidase described here. The three enzymes are differentially regulated during the asexual life cycle and under stress conditions. They all have a chlorin in its active site and are resistant to molar concentrations of H₂O₂. Like all cata-

lases so far tested, these three catalases are oxidized by ¹O₂, probably at the chlorin. Oxidized catalases apparently are not affected in their activity, but are likely degraded and re-synthesized depending on whether growth can be reassumed or a resistant cell, such as a spore, is made.

Acknowledgements

This research was supported in part by grant number IN214199 from DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México, and grant 33148-N from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

We thank Dr. Armando Gómez-Puyou and Dr. Jesús Aguirre for critically reading the manuscript. We are also grateful to Mark West for help with the HPLC analysis. The amino acid sequence was carried out by Jacques d'Aleyer at the Pasteur Institute (Paris, France) and the oligonucleotide synthesis and DNA sequence at the Unidad de Biología Molecular of our Institute.

References

- Aguirre, J. and Hansberg, W. (1986). Oxidation of *Neurospora crassa* glutamine synthetase. *J. Bacteriol.* **166**, 1040–1045.
- Aguirre, J., Rodríguez, R. and Hansberg, W. (1989). Oxidation of *Neurospora crassa* NADP-specific glutamate dehydrogenase by activated oxygen species. *J. Bacteriol.* **171**, 6243–6250.
- Bravo, J., Fita, I., Gouet, P., Jouve, H.M., Melik-Adamy, W. and Murshudov, G.N. (1997). Structure of catalases. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, J.G. Scandalios, ed. (Cold Spring Harbor, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 407–445.
- Buzy, A., Bracchi, V., Sterjiades, R., Chroboczek, J., Thibault, P., Gagnon, J., Jouve, H.M. and Hurdy-Clergeon, G. (1995). Complete amino acid sequence of *Proteus mirabilis* PR catalase. Occurrence of a methionine sulfone in the close proximity of the active site. *J. Protein. Chem.* **14**, 59–72.
- Calera, J.A., Paris, S., Monod, M., Hamilton, A.J., Debeauvais, J.P., Diaquin, M., López-Medrano R., Leal, F. and Latge, J.P. (1997). Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **65**, 4718–4724.
- Chary, P. and Natvig, D.O. (1989). Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock, and development. *J. Bacteriol.* **171**, 2646–2652.
- Díaz, A., Rangel, P., Montes de Oca, Y., Lledías, F. and Hansberg, W. (2001). Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1323–1333.
- Fraaije M.W., Roubroeks, H.P., Hagen, W.R. and van Berkel, W.J.H. (1996). Purification and characterization of an intracellular catalase-peroxidase from *Penicillium simplicissimus*. *Eur. J. Biochem.* **235**, 191–198.
- Garre V., Muller, U. and Tudzynski, P. (1998). Cloning, characterization, and targeted disruption of *cpcat1*, coding for an in planta secreted catalase of *Claviceps purpurea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**, 772–783.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1998). *Free radicals in biology and medicine* (Oxford, UK: Clarendon Press).
- Hansberg, W. (1996). A hyperoxidant state at the start of each developmental stage during *Neurospora crassa* conidiation. *Ciência Cultura* **48**, 68–74.

- Hansberg, W. and Aguirre, J. (1990). Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell insulation from dioxygen. *J. Theor. Biol.* **142**, 201–221.
- Hansberg, W., de Groot, H. and Sies, H. (1993). Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radic. Biol. Med.* **14**, 287–293.
- Jacob, G.S. and Orme-Johnson, W.H. (1979). Catalase of *Neurospora crassa*. 2. Electron paramagnetic resonance and chemical properties of the prosthetic group. *Biochemistry* **18**, 2975–2980.
- Klotz, M.G., Klassen, G.R. and Loewen, P.C. (1997). Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Mol. Biol. Evol.* **14**, 951–958.
- Levy, E., Eyal, Z. and Hochman, A. (1992). Purification and characterization of a catalase-peroxidase from the fungus *Septoria tritici*. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**, 321–327.
- Lledías, F. and Hansberg, W. (2000). Catalase modification as a marker for singlet oxygen. *Methods Enzymol.* **319**, 110–119.
- Lledías, F., Rangel, P. and Hansberg, W. (1998). Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* **273**, 10630–10637.
- Lledías, F., Rangel, P. and Hansberg, W. (1999). Singlet oxygen is part of a hyperoxidant state generated during spore germination. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1396–1404.
- Loewen, P.C., Switala, J., von Ossowski, I., Hillar, A., Chistie, A., Tattrie, B. and Nicholls, P. (1993). Catalase HPII of *Escherichia coli* catalyzes the conversion of protoheme to *cis*-heme *d*. *Biochemistry* **32**, 10159–10164.
- Montes de Oca, Y. (1999). Bachelor Thesis, School of Veterinary Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City.
- Murshudov, G.N., Grebenko, A.I., Barynin, V., Dauter, Z., Wilson, K.S., Vainshtein, B.K., Melik-Adamyanyan, W., Bravo, J., Ferrán, J.M., Ferrer, J.C., Switala, J., Loewen, P.C. and Fita, I. (1996). Structure of the heme *d* of *Penicillium vitale* and *Escherichia coli* catalases. *J. Biol. Chem.* **271**, 8863–8868.
- Navarro, R.E., Stringer, M.A., Hansberg, W., Timberlake, W.E. and Aguirre, J. (1996). *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr. Genet.* **29**, 352–359.
- Switala, J., O'Neil, J.O. and Loewen, P.C. (1999). Catalase HPII from *Escherichia coli* exhibits enhanced resistance to denaturation. *Biochemistry* **38**, 3895–3901.
- Swofford, D.L. (1993). PAUP: phylogenetic analysis using parsimony (Champaign, USA: Illinois Natural History Survey).
- Toledo, I. and Hansberg, W. (1990). Protein oxidation related to morphogenesis in *Neurospora crassa*. *Exp. Mycol.* **14**, 184–189.
- Toledo, I., Aguirre, J. and Hansberg, W. (1986). Aerial growth in *Neurospora crassa*: characterization of an experimental model system. *Exp. Mycol.* **10**, 114–125.
- Toledo, I., Noronha-Dutra, A.A. and Hansberg, W. (1991). Loss of NAD(P)-reducing power and glutathione disulfide excretion at the start of induction of aerial growth in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **173**, 3243–3249.
- Toledo, I., Aguirre, J. and Hansberg, W. (1994). Enzyme inactivation related to a hyperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*. *Microbiol.* **140**, 2391–2397.
- Toledo, I., Rangel, P. and Hansberg, W. (1995). Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation. *Arch. Biochem. Biophys.* **319**, 519–524.
- Welinder, K.G. (1991). Bacterial catalase-peroxidase are gene duplicated members of the plant peroxidase superfamily. *Biochim. Biophys. Acta* **1080**, 215–220.
- Zámocky, M. and Koller, F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and *in vitro* mutagenesis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **72**, 19–66.
- Zámocky, M., Janecek, S. and Koller, F. (2000). Common phylogeny of catalase-peroxidases and ascorbate peroxidases. *Gene* **256**, 169–182.

REFERENCIAS

- Aguirre, J. y W. Hansberg (1986). Oxidation of *Neurospora crassa* glutamine synthetase. *Journal of Bacteriology* **166**(3): 1040-5.
- Aguirre, J., R. Rodríguez y W. Hansberg (1989). Oxidation of *Neurospora crassa* NADP-specific glutamate dehydrogenase by activated oxygen species. *Journal of Bacteriology* **171**(11): 6243-50.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y P. Walter (2002). *Molecular biology of the cell*. New York, Garland Science.
- Allgood, G. S. y J. J. Perry (1986). Characterization of a manganese-containing catalase from the obligate thermophile *Thermoleophilum album*. *Journal of Bacteriology* **168**(2): 563-7.
- Amo, T., H. Atomi y T. Imanaka (2002). Unique presence of a manganese catalase in a hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum caldifontis* VA1. *Journal of Bacteriology* **184**(12): 3305-12.
- Aramayo, R. y R. L. Metzenberg (1996). Gene replacements at the his-3 locus of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics Newsletter* **43**: 9-13.
- Babior, B. M. (2004). NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology* **16**(1): 42-7.
- Bandyopadhyay, P., B. Byrne, Y. Chan, M. S. Swanson y H. M. Steinman (2003). *Legionella pneumophila* catalase-peroxidases are required for proper trafficking and growth in primary macrophages. *Infection and Immunity* **71**(8): 4526-35.
- Bandyopadhyay, P. y H. M. Steinman (1998). *Legionella pneumophila* catalase-peroxidases: cloning of the katB gene and studies of KatB function. *Journal of Bacteriology* **180**(20): 5369-74.
- Bandyopadhyay, P. y H. M. Steinman (2000). Catalase-peroxidases of *Legionella pneumophila*: cloning of the katA gene and studies of KatA function. *Journal of Bacteriology* **182**(23): 6679-86.
- Berteaux-Lecellier, V., M. Picard, C. Thompson-Coffe, D. Zickler, A. Panvier-Adoutte y J. M. Simonet (1995). A nonmammalian homolog of the PAF1 gene (Zellweger syndrome) discovered as a gene involved in caryogamy in the fungus *Podospora anserina*. *Cell* **81**(7): 1043-51.
- Bertrand, T., N. A. Eady, J. N. Jones, Jesmin, J. M. Nagy, B. Jamart-Gregoire, E. L. Raven y K. A. Brown (2004). Crystal Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* **279**(37): 38991-38999.
- Billman-Jacobe, H., J. Sloan y R. L. Coppel (1996). Analysis of isoniazid-resistant transposon mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiology Letters* **144**(1): 47-52.
- Bonagura, C. A., M. Sundaramoorthy, B. Bhaskar y T. L. Poulos (1999). The effects of an engineered cation site on the structure, activity, and EPR properties of cytochrome c peroxidase. *Biochemistry* **38**(17): 5538-45.
- Brigelius-Flohe, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine* **27**(9-10): 951-65.
- Brown-Peterson, N. J. y M. L. Salin (1993). Purification of a catalase-peroxidase from *Halobacterium halobium*: characterization of some unique properties of the halophilic enzyme. *Journal of Bacteriology* **175**(13): 4197-202.

- Brown-Peterson, N. J. y M. L. Salin (1995). Purification and characterization of a mesohalic catalase from the halophilic bacterium *Halobacterium halobium*. *Journal of Bacteriology* **177**(2): 378-84.
- Brunder, W., H. Schmidt y H. Karch (1996). KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* **142** (Pt 11): 3305-15.
- Brunk, U. T. y A. Terman (2002). The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *European Journal of Biochemistry* **269**(8): 1996-2002.
- Carmel-Harel, O. y G. Storz (2000). Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annual Review of Microbiology* **54**: 439-61.
- Carpena, X., S. Loprasert, S. Mongkolsuk, J. Switala, P. C. Loewen y I. Fita (2003). Catalase-peroxidase KatG of *Burkholderia pseudomallei* at 1.7Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **327**(2): 475-89.
- Carson, M. (1997). Ribbons. *Methods in Enzymology* **277**: 493-502.
- Cendrin, F., H. M. Jouve, J. Gaillard, P. Thibault y G. Zaccari (1994). Purification and properties of a halophilic catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1209**(1): 1-9.
- Chary, P. y D. O. Natvig (1989). Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock, and development. *Journal of Bacteriology* **171**(5): 2646-52.
- Claiborne, A. y I. Fridovich (1979). Purification of the o-dianisidine peroxidase from *Escherichia coli* B. Physicochemical characterization and analysis of its dual catalytic and peroxidatic activities. *Journal of Biological Chemistry* **254**(10): 4245-52.
- Claros, M. G. y P. Vincens (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *European Journal of Biochemistry* **241**(3): 779-86.
- Coppin, E., R. Debuchy, S. Arnaise y M. Picard (1997). Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**(4): 411-28.
- Davidson, J. F. y R. H. Schiestl (2001). Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **21**(24): 8483-9.
- Davidson, J. F., B. Whyte, P. H. Bissinger y R. H. Schiestl (1996). Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(10): 5116-21.
- Davis, R. H. (2000). *Neurospora : contributions of a model organism*. Oxford ; New York, Oxford University Press.
- Davis, R. H. y F. J. de Serres (1970). Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods in Enzymology* **17**(A): 79-143.
- Davis, R. H. y D. D. Perkins (2002). Timeline: *Neurospora*: a model of model microbes. *Nature reviews. Genetics* **3**(5): 397-403.
- de Zoysa, P. A. y I. F. Connerton (1994). The function and specificity of the C-terminal tripeptide glyoxysomal targeting signal in *Neurospora crassa*. *Current Genetics* **26**(5-6): 430-7.

- del Rio, L. A., F. J. Corpas, L. M. Sandalio, J. M. Palma y J. B. Barroso (2003). Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. *IUBMB Life* **55**(2): 71-81.
- Dembowski, M., K. P. Kunkele, F. E. Nargang, W. Neupert y D. Rapaport (2001). Assembly of Tom6 and Tom7 into the TOM core complex of *Neurospora crassa*. *Journal of Biological Chemistry* **276**(21): 17679-85.
- Dementhon, K., S. J. Saupe y C. Clave (2004). Characterization of IDI-4, a bZIP transcription factor inducing autophagy and cell death in the fungus *Podospora anserina*. *Molecular Microbiology* **53**(6): 1625-40.
- Díaz, A., E. Horjales, E. Rudiño-Piñera, R. Arreola y W. Hansberg (2004). Unusual cys-tyr covalent bond in a large catalase. *Journal of Molecular Biology* **342**(3): 971-85.
- Díaz, A., R. A. Muñoz-Clares, P. Rangel, V. J. Valdés y W. Hansberg (2005). Functional and structural analysis of catalase oxidized by singlet oxygen. *Biochimie* **87**(2): 205-14.
- Díaz, A., P. Rangel, Y. Montes de Oca, F. Lledías y W. Hansberg (2001). Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Radical Biology and Medicine* **31**(11): 1323-33.
- Duroux, L. y K. G. Welinder (2003). The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview. *Journal of Molecular Evolution* **57**(4): 397-407.
- Ebbole, D. J. (1990). Vectors for construction of translational fusions to beta-galactosidase. *Fungal Genetics Newsletter* **37**: 15-16.
- Ehrt, S., M. U. Shiloh, J. Ruan, M. Choi, S. Gunzburg, C. Nathan, Q. Xie y L. W. Riley (1997). A novel antioxidant gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Experimental Medicine* **186**(11): 1885-96.
- Emanuelsson, O., H. Nielsen, S. Brunak y G. von Heijne (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology* **300**(4): 1005-16.
- Estruch, F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiology Reviews* **24**(4): 469-86.
- Felsenstein, J. (1989). PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**: 164-166.
- Flohe, L. y W. A. Gunzler (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* **105**: 114-21.
- Flohe, L., H. J. Hecht y P. Steinert (1999). Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. *Free Radical Biology and Medicine* **27**(9-10): 966-84.
- Fraaije, M. W., H. P. Roubroeks, W. R. Hagen y W. J. Van Berkel (1996). Purification and characterization of an intracellular catalase-peroxidase from *Penicillium simplicissimum*. *European Journal of Biochemistry* **235**(1-2): 192-8.
- Galagan, J. E., S. E. Calvo, *et al.* (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* **422**(6934): 859-68.
- Galiazzo, F., A. Schiesser y G. Rotilio (1987). Glutathione peroxidase in yeast. Presence of the enzyme and induction by oxidative conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **147**(3): 1200-5.
- Galkin, A. y U. Brandt (2005). Superoxide radical formation by pure complex I (NADH: Ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biological Chemistry*.

- García, E., Y. A. Nedialkov, J. Elliott, V. L. Motin y R. R. Brubaker (1999). Molecular characterization of KatY (antigen 5), a thermoregulated chromosomally encoded catalase-peroxidase of *Yersinia pestis*. *Journal of Bacteriology* **181**(10): 3114-22.
- Ghibaudi, E. y E. Laurenti (2003). Unraveling the catalytic mechanism of lactoperoxidase and myeloperoxidase. *European Journal of Biochemistry* **270**(22): 4403-12.
- Goldberg, I. y A. Hochman (1989). Purification and characterization of a novel type of catalase from the bacterium *Klebsiella pneumoniae*. *Biochimica et Biophysica Acta* **991**(2): 330-6.
- Gonzalez, C. I., A. Bhattacharya, W. Wang y S. W. Peltz (2001). Nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **274**(1-2): 15-25.
- Gow, N. A. R. y G. M. Gadd (1995). *The growing fungus*. London, Chapman & Hall.
- Green, M. J. y H. A. Hill (1984). Chemistry of dioxygen. *Methods in Enzymology* **105**: 3-22.
- Guex, N. y M. C. Peitsch (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**(15): 2714-23.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.
- Halliwell, B. y J. M. C. Gutteridge (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford ; New York, Oxford University Press.
- Hansberg, W. (1996). A hyperoxidant state at the start of each developmental stage during *Neurospora crassa* conidiation. *Ciência e cultura* **48**(1/2): 67-74.
- Hansberg, W. y J. Aguirre (1990). Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *Journal of Theoretical Biology* **142**(2): 201-21.
- Hansberg, W., H. de Groot y H. Sies (1993). Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radical Biology and Medicine* **14**(3): 287-93.
- Havir, E. A. y N. A. McHale (1990). Purification and characterization of an isozyme of catalase with enhanced-peroxidatic activity from leaves of *Nicotiana glauca*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **283**(2): 491-5.
- Heckman, D. S., D. M. Geiser, B. R. Eidell, R. L. Stauffer, N. L. Kardos y S. B. Hedges (2001). Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* **293**(5532): 1129-33.
- Heering, H. A., A. T. Smith y G. Smulevich (2002). Spectroscopic characterization of mutations at the Phe41 position in the distal haem pocket of horseradish peroxidase C: structural and functional consequences. *Biochemical Journal* **363**(Pt 3): 571-9.
- Hernández-Ruíz, J., M. B. Arnao, A. N. Hiner, F. García-Canovas y M. Acosta (2001). Catalase-like activity of horseradish peroxidase: relationship to enzyme inactivation by H₂O₂. *Biochemical Journal* **354**(Pt 1): 107-14.
- Heym, B., P. M. Alzari, N. Honore y S. T. Cole (1995). Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* **15**(2): 235-45.

- Heym, B., Y. Zhang, S. Poulet, D. Young y S. T. Cole (1993). Characterization of the katG gene encoding a catalase-peroxidase required for the isoniazid susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Bacteriology* **175**(13): 4255-9.
- Hillar, A., B. Peters, R. Pauls, A. Loboda, H. Zhang, A. G. Mauk y P. C. Loewen (2000). Modulation of the activities of catalase-peroxidase HPI of Escherichia coli by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **39**(19): 5868-75.
- Hiner, A. N., J. Hernández-Ruiz, F. García-Canovas, A. T. Smith, M. B. Arnao y M. Acosta (1995). A comparative study of the inactivation of wild-type, recombinant and two mutant horseradish peroxidase isoenzymes C by hydrogen peroxide and m-chloroperoxybenzoic acid. *European Journal of Biochemistry* **234**(2): 506-12.
- Hiner, A. N., J. N. Rodríguez-López, M. B. Arnao, E. Lloyd Raven, F. García-Canovas y M. Acosta (2000). Kinetic study of the inactivation of ascorbate peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochemical Journal* **348 Pt 2**: 321-8.
- Hochman, A., A. Figueredo y J. D. Wall (1992). Physiological functions of hydroperoxidases in Rhodobacter capsulatus. *Journal of Bacteriology* **174**(10): 3386-91.
- Hochman, A. y I. Goldberg (1991). Purification and characterization of a catalase-peroxidase and a typical catalase from the bacterium Klebsiella pneumoniae. *Biochimica et Biophysica Acta* **1077**(3): 299-307.
- Hofmann, B., H. J. Hecht y L. Flohe (2002). Peroxiredoxins. *Biological Chemistry* **383**(3-4): 347-64.
- Horiguchi, H., H. Yurimoto, N. Kato y Y. Sakai (2001). Antioxidant system within yeast peroxisome. Biochemical and physiological characterization of CbPmp20 in the methylotrophic yeast Candida boidinii. *Journal of Biological Chemistry* **276**(17): 14279-88.
- Howes, B. D., J. N. Rodríguez-López, A. T. Smith y G. Smulevich (1997). Mutation of distal residues of horseradish peroxidase: influence on substrate binding and cavity properties. *Biochemistry* **36**(6): 1532-43.
- Hultquist, D. E. y M. Morrison (1963). Lactoperoxidase. I. The Prosthetic Group of Lactoperoxidase. *Journal of Biological Chemistry* **238**: 2843-6.
- Igarashi, T., Y. Kono y K. Tanaka (1996). Molecular cloning of manganese catalase from Lactobacillus plantarum. *Journal of Biological Chemistry* **271**(47): 29521-4.
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology* **57**: 395-418.
- Inoue, M., E. F. Sato, M. Nishikawa, A. M. Park, Y. Kira, I. Imada y K. Utsumi (2003). Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry* **10**(23): 2495-505.
- Irelan, J. T., A. T. Hagemann y E. U. Selker (1994). High frequency repeat-induced point mutation (RIP) is not associated with efficient recombination in Neurospora. *Genetics* **138**(4): 1093-103.
- Jacob, G. S. y W. H. Orme-Johnson (1979a). Catalase of Neurospora crassa. 1. Induction, purification, and physical properties. *Biochemistry* **18**(14): 2967-75.
- Jacob, G. S. y W. H. Orme-Johnson (1979b). Catalase of Neurospora crassa. 2. Electron paramagnetic resonance and chemical properties of the prosthetic group. *Biochemistry* **18**(14): 2975-80.
- Jakopitsch, C., M. Auer, A. Ivancich, F. Ruker, P. G. Furtmuller y C. Obinger (2003a). Total conversion of bifunctional catalase-peroxidase (KatG) to monofunctional peroxidase by exchange of a conserved distal side tyrosine. *Journal of Biological Chemistry* **278**(22): 20185-91.

- Jakopitsch, C., M. Auer, G. Regelsberger, W. Jantschko, P. G. Furtmuller, F. Ruker y C. Obinger (2003b). Distal site aspartate is essential in the catalase activity of catalase-peroxidases. *Biochemistry* **42**(18): 5292-300.
- Jakopitsch, C., G. Regelsberger, P. G. Furtmuller, F. Ruker, G. A. Peschek y C. Obinger (2001). Catalase-peroxidase from synechocystis is capable of chlorination and bromination reactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **287**(3): 682-7.
- Jakopitsch, C., G. Regelsberger, P. G. Furtmuller, F. Ruker, G. A. Peschek y C. Obinger (2002). Engineering the proximal heme cavity of catalase-peroxidase. *Journal of Inorganic Biochemistry* **91**(1): 78-86.
- Jedd, G. y N. H. Chua (2000). A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nature cell biology* **2**(4): 226-31.
- Jones, P. (2001). Roles of water in heme peroxidase and catalase mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **276**(17): 13791-6.
- Jones, T. A., J. Y. Zou, S. W. Cowan y Kjeldgaard (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallographica. Section A, Crystal Physics, Diffraction, Theoretical and General Crystallography* **47 (Pt 2)**: 110-9.
- Kapoor, M. y J. Lewis (1987). Heat shock induces peroxidase activity in *Neurospora crassa* and confers tolerance toward oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **147**(3): 904-10.
- Kapoor, M., G. M. Sreenivasan, N. Goel y J. Lewis (1990). Development of thermotolerance in *Neurospora crassa* by heat shock and other stresses eliciting peroxidase induction. *Journal of Bacteriology* **172**(5): 2798-801.
- Kawasaki, L. y J. Aguirre (2001). Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* **183**(4): 1434-40.
- Kawasaki, L., D. Wysong, R. Diamond y J. Aguirre (1997). Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *Journal of Bacteriology* **179**(10): 3284-92.
- Kengen, S. W., F. J. Bikker, W. R. Hagen, W. M. de Vos y J. van der Oost (2001). Characterization of a catalase-peroxidase from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Extremophiles* **5**(5): 323-32.
- Kionka, C. y W. H. Kunau (1985). Inducible beta-oxidation pathway in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* **161**(1): 153-7.
- Klotz, M. G., G. R. Klassen y P. C. Loewen (1997). Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Molecular Biology and Evolution* **14**(9): 951-8.
- Klotz, M. G. y P. C. Loewen (2003). The molecular evolution of catalatic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from bacteria into eukaryota. *Molecular Biology and Evolution* **20**(7): 1098-112.
- Kono, Y. y I. Fridovich (1983). Isolation and characterization of the pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Biological Chemistry* **258**(10): 6015-9.
- Krenn, B. E., M. G. Tromp y R. Wever (1989). The brown alga *Ascophyllum nodosum* contains two different vanadium bromoperoxidases. *Journal of Biological Chemistry* **264**(32): 19287-92.

- Kupiec, J. J. (1997). A Darwinian theory for the origin of cellular differentiation. *Molecular and General Genetics* **255**(2): 201-8.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lara-Ortíz, T., H. Riveros-Rosas y J. Aguirre (2003). Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **50**(4): 1241-55.
- Levine, B. y D. J. Klionsky (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental cell* **6**(4): 463-77.
- Levy, E., Z. Eyal y A. Hochman (1992). Purification and characterization of a catalase-peroxidase from the fungus *Septoria tritici*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **296**(1): 321-7.
- Lin, W. S. y M. Kapoor (1992). Increase in superoxide production by heat-shocked cells of *Neurospora crassa*, demonstrated by a fluorometric assay. *International Journal of Biochemistry* **24**(7): 1081-6.
- Littlechild, J. (1999). Haloperoxidases and their role in biotransformation reactions. *Current Opinion in Chemical Biology* **3**(1): 28-34.
- Liu, Y. (2003). Molecular mechanisms of entrainment in the *Neurospora* circadian clock. *Journal of Biological Rhythms* **18**(3): 195-205.
- Lledías, F., P. Rangel y W. Hansberg (1998). Oxidation of catalase by singlet oxygen. *Journal of Biological Chemistry* **273**(17): 10630-7.
- Loewen, P. C. y J. Switala (1986). Purification and characterization of catalase HPII from *Escherichia coli* K12. *Biochemistry and Cell Biology* **64**(7): 638-46.
- Loewen, P. C., J. Switala, I. von Ossowski, A. Hillar, A. Christie, B. Tattre y P. Nicholls (1993). Catalase HPII of *Escherichia coli* catalyzes the conversion of protoheme to cis-heme d. *Biochemistry* **32**(38): 10159-64.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**(1): 265-75.
- Machwe, A., A. M. Senczuk y M. Kapoor (2002). Induction profiles and properties of a novel stress-induced peroxidase in *Neurospora crassa*. *Mycoscience* **43**(2): 103-111.
- Maddipati, K. R. y L. J. Marnett (1987). Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. Purification and properties of a selenium-dependent glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* **262**(36): 17398-403.
- Magliozzo, R. S. y J. A. Marcinkeviciene (1997). The role of Mn(II)-peroxidase activity of mycobacterial catalase-peroxidase in activation of the antibiotic isoniazid. *Journal of Biological Chemistry* **272**(14): 8867-70.
- Maheshwari, R. (1991). Microcycle conidiation and its genetic basis in *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology* **137** (Pt 9): 2103-15.
- Maheshwari, R. (1999). Microconidia of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* **26**(1): 1-18.

- Malagnac, F., H. Lalucque, G. Lepere y P. Silar (2004). Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genetics and Biology* **41**(11): 982-97.
- Marcinkeviciene, J. A., R. S. Magliozzo y J. S. Blanchard (1995). Purification and characterization of the *Mycobacterium smegmatis* catalase-peroxidase involved in isoniazid activation. *Journal of Biological Chemistry* **270**(38): 22290-5.
- Margolin, B. S., M. Freitag y E. U. Selker (1997). Improved plasmids for gene targeting at the his-3 locus of *Neurospora crassa* by electroporation. *Fungal Genetics Newsletter* **44**: 34-36.
- Mark, S. (1984). Fumarase. *Methods of Enzymatic Analysis*. H. U. Bergmeyer. Weinheim, Verlag Chemie. **Vol. 4**: 359-362.
- McCluskey, K. (2003). The Fungal Genetics Stock Center: from molds to molecules. *Advances in Applied Microbiology* **52**: 245-62.
- Michán, S., F. Lledías, J. D. Baldwin, D. O. Natvig y W. Hansberg (2002). Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. *Free Radical Biology and Medicine* **33**(4): 521-32.
- Montes de Oca, Y. (1999). *Detección intracelular de catalasas durante el ciclo de crecimiento y conidiación de Neurospora crassa*. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 65pp
- Moye-Rowley, W. S. (2003). Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryotic Cell* **2**(3): 381-9.
- Muller, B. T. y V. R. A. Russo (1989). Nitrogen starvation or glucose limitation induces conidiation in constantly shaken liquid cultures of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics Newsletter* **36**: 58-60.
- Nagy, J. M., A. E. Cass y K. A. Brown (1997). Purification and characterization of recombinant catalase-peroxidase, which confers isoniazid sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* **272**(50): 31265-71.
- Nakai, K. y P. Horton (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends in Biochemical Sciences* **24**(1): 34-6.
- Navarro, R. E. y J. Aguirre (1998). Posttranscriptional control mediates cell type-specific localization of catalase A during *Aspergillus nidulans* development. *Journal of Bacteriology* **180**(21): 5733-8.
- Navarro, R. E., M. A. Stringer, W. Hansberg, W. E. Timberlake y J. Aguirre (1996). *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Current Genetics* **29**(4): 352-9.
- Nelson, M. A., S. Kang, *et al.* (1997). Expressed sequences from conidial, mycelial, and sexual stages of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* **21**(3): 348-63.
- Nohl, H., L. Gille y K. Staniek (2005). Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochemical Pharmacology* **69**(5): 719-23.
- Noventa-Jordao, M. A., R. M. Couto, M. H. Goldman, J. Aguirre, S. Iyer, A. Caplan, H. F. Terenzi y G. H. Goldman (1999). Catalase activity is necessary for heat-shock recovery in *Aspergillus nidulans* germlings. *Microbiology* **145** (Pt 11): 3229-34.
- Obinger, C., G. Regelsberger, P. G. Furtmuller, C. Jakopitsch, F. Ruker, A. Pircher y G. A. Peschek (1999). Catalase-peroxidases in cyanobacteria--similarities and differences to ascorbate peroxidases. *Free Radical Research* **31** Suppl: S243-9.

- Obinger, C., G. Regelsberger, G. Strasser, U. Burner y G. A. Peschek (1997). Purification and characterization of a homodimeric catalase-peroxidase from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **235**(3): 545-52.
- O'Brien, P. J. (2000). Peroxidases. *Chemico-Biological Interactions* **129**(1-2): 113-39.
- Ogura, Y. y I. Yamazaki (1983). Steady-state kinetics of the catalase reaction in the presence of cyanide. *Journal of Biochemistry* **94**(2): 403-8.
- Paldi, A. (2003). Stochastic gene expression during cell differentiation: order from disorder? *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**(9): 1775-8.
- Paris, S., D. Wysong, J. P. Debeauvais, K. Shibuya, B. Philippe, R. D. Diamond y J. P. Latge (2003). Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity* **71**(6): 3551-62.
- Perelman, A., A. Uzan, D. Hacoen y R. Schwarz (2003). Oxidative stress in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: various mechanisms for H₂O₂ detoxification with different physiological roles. *Journal of Bacteriology* **185**(12): 3654-60.
- Pinan-Lucarre, B., M. Paoletti, K. Dementhon, B. Couлары-Salin y C. Clave (2003). Autophagy is induced during cell death by incompatibility and is essential for differentiation in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Molecular Microbiology* **47**(2): 321-33.
- Pirkkala, L., P. Nykanen y L. Sistonen (2001). Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB Journal* **15**(7): 1118-31.
- Purdue, P. E. y P. B. Lazarow (2001). Peroxisome biogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **17**: 701-52.
- Putter, J. y R. Becker (1984). Peroxidases. *Methods of Enzymatic Analysis*. H. U. Bergmeyer. Weinheim, Verlag Chemie. **Vol. 3**: 286-293.
- Regelsberger, G., C. Jakopitsch, M. Engleder, F. Ruker, G. A. Peschek y C. Obinger (1999). Spectral and kinetic studies of the oxidation of monosubstituted phenols and anilines by recombinant *Synechocystis* catalase-peroxidase compound I. *Biochemistry* **38**(32): 10480-8.
- Regelsberger, G., C. Jakopitsch, P. G. Furtmuller, F. Rueker, J. Switala, P. C. Loewen y C. Obinger (2001). The role of distal tryptophan in the bifunctional activity of catalase-peroxidases. *Biochemical Society Transactions* **29**(Pt 2): 99-105.
- Regelsberger, G., C. Jakopitsch, F. Ruker, D. Krois, G. A. Peschek y C. Obinger (2000). Effect of distal cavity mutations on the formation of compound I in catalase-peroxidases. *Journal of Biological Chemistry* **275**(30): 22854-61.
- Roe, J. A. y D. B. Goodin (1993). Enhanced oxidation of aniline derivatives by two mutants of cytochrome c peroxidase at tryptophan 51. *Journal of Biological Chemistry* **268**(27): 20037-45.
- Sambrook, J. y D. W. Russell (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scherer, M., H. Wei, R. Liese y R. Fischer (2002). *Aspergillus nidulans* catalase-peroxidase gene (*cpeA*) is transcriptionally induced during sexual development through the transcription factor *StuA*. *Eukaryotic Cell* **1**(5): 725-35.
- Schwede, T., J. Kopp, N. Guex y M. C. Peitsch (2003). SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* **31**(13): 3381-5.

- Selker, E. U. (1997). Epigenetic phenomena in filamentous fungi: useful paradigms or repeat-induced confusion? *Trends in Genetics* **13**(8): 296-301.
- Senczuk, A. M., A. Machwe y M. Kapoor (2003). High constitutive peroxidase activity and constitutive thermotolerance in *Neurospora crassa*. *Mycoscience* **44**(2): 129-137.
- Shima, S., A. Netrusov, M. Sordel, M. Wicke, G. C. Hartmann y R. K. Thauer (1999). Purification, characterization, and primary structure of a monofunctional catalase from *Methanosarcina barkeri*. *Archives of Microbiology* **171**(5): 317-23.
- Shima, S., M. Sordel-Klippert, A. Brioukhanov, A. Netrusov, D. Linder y R. K. Thauer (2001). Characterization of a heme-dependent catalase from *Methanobrevibacter arboriphilus*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(7): 3041-5.
- Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine* **27**(9-10): 916-21.
- Simmons, J., P. Chary y D. O. Natvig (1987). Linkage group assignments for two *Neurospora crassa* catalase genes: the Metzberg RFLP mapping kit applied to an enzyme polymorphism. *Fungal Genetics Newsletter* **34**: 55-56.
- Singh, R., B. Wiseman, T. Deemagarn, L. J. Donald, H. W. Duckworth, X. Carpena, I. Fita y P. C. Loewen (2004). Catalase-peroxidases (KatG) exhibit NADH oxidase activity. *Journal of Biological Chemistry* **279**(41): 43098-106.
- Smith, A. T. y N. C. Veitch (1998). Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. *Current Opinion in Chemical Biology* **2**(2): 269-78.
- Springer, M. L. (1993). Genetic control of fungal differentiation: the three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. *Bioessays* **15**(6): 365-74.
- Steinman, H. M., F. Fareed y L. Weinstein (1997). Catalase-peroxidase of *Caulobacter crescentus*: function and role in stationary-phase survival. *Journal of Bacteriology* **179**(21): 6831-6.
- Sun, W., T. A. Kadima, M. A. Pickard y H. B. Dunford (1994). Catalase activity of chloroperoxidase and its interaction with peroxidase activity. *Biochemistry and Cell Biology* **72**(7-8): 321-31.
- Switala, J. y P. C. Loewen (2002). Diversity of properties among catalases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **401**(2): 145-54.
- Swofford, D. L. (1991). PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Illinois Natural History Survey, Champaign Illinois. Version 3.1.
- Swofford, D. L. (2003). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Version 4.
- Taurog, A. (1999). Molecular evolution of thyroid peroxidase. *Biochimie* **81**(5): 557-62.
- Tenney, K., I. Hunt, J. Sweigard, J. I. Pounder, C. McClain, E. J. Bowman y B. J. Bowman (2000). Hex-1, a gene unique to filamentous fungi, encodes the major protein of the Woronin body and functions as a plug for septal pores. *Fungal Genetics and Biology* **31**(3): 205-17.
- Thieringer, R. y W. H. Kunau (1991). The beta-oxidation system in catalase-free microbodies of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Purification of a multifunctional protein possessing 2-enoyl-CoA hydratase, L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, and 3-hydroxyacyl-CoA epimerase activities. *Journal of Biological Chemistry* **266**(20): 13110-7.

- Thompson, J. D., D. G. Higgins y T. J. Gibson (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**(22): 4673-80.
- Thrane, C., U. Kaufmann, B. M. Stummann y S. Olsson (2004). Activation of caspase-like activity and poly (ADP-ribose) polymerase degradation during sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* **41**(3): 361-8.
- Tichy, M. y W. Vermaas (1999). In vivo role of catalase-peroxidase in *synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology* **181**(6): 1875-82.
- Timberlake, W. E. (1980). Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. *Developmental Biology* **78**(2): 497-510.
- Toledo, I., J. Aguirre y W. Hansberg (1986). Aerial growth in *Neurospora crassa*: Characterization of an Experimental Model System. *Experimental Mycology* **10**(2): 114-125.
- Toledo, I., J. Aguirre y W. Hansberg (1994). Enzyme inactivation related to a hyperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*. *Microbiology* **140** (Pt 9): 2391-7.
- Toledo, I., A. A. Noronha-Dutra y W. Hansberg (1991). Loss of NAD(P)-reducing power and glutathione disulfide excretion at the start of induction of aerial growth in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* **173**(10): 3243-9.
- Toledo, I., P. Rangel y W. Hansberg (1995). Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **319**(2): 519-24.
- Ursini, F., M. Maiorino, R. Brigelius-Flohe, K. D. Aumann, A. Roveri, D. Schomburg y L. Flohe (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Methods in Enzymology* **252**: 38-53.
- van den Bosch, H., R. B. Schutgens, R. J. Wanders y J. M. Tager (1992). Biochemistry of peroxisomes. *Annual Review of Biochemistry* **61**: 157-97.
- Vargas, M. C., S. Encarnación, A. Dávalos, A. Reyes-Perez, Y. Mora, A. García-de los Santos, S. Brom y J. Mora (2003). Only one catalase, katG, is detectable in *Rhizobium etli*, and is encoded along with the regulator OxyR on a plasmid replicon. *Microbiology* **149**(Pt 5): 1165-76.
- Vitello, L. B., J. E. Erman, M. A. Miller, J. Wang y J. Kraut (1993). Effect of arginine-48 replacement on the reaction between cytochrome c peroxidase and hydrogen peroxide. *Biochemistry* **32**(37): 9807-18.
- von Ossowski, I., G. Hausner y P. C. Loewen (1993). Molecular evolutionary analysis based on the amino acid sequence of catalase. *Journal of Molecular Evolution* **37**(1): 71-6.
- Welinder, K. G. (1985). Plant peroxidases. Their primary, secondary and tertiary structures, and relation to cytochrome c peroxidase. *European Journal of Biochemistry* **151**(3): 497-504.
- Welinder, K. G. (1991). Bacterial catalase-peroxidases are gene duplicated members of the plant peroxidase superfamily. *Biochimica et Biophysica Acta* **1080**(3): 215-20.
- Welinder, K. G. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* **2**(3): 388-393.
- Welinder, K. G., J. M. Mauro y L. Norskov-Lauritsen (1992). Structure of plant and fungal peroxidases. *Biochemical Society Transactions* **20**(2): 337-40.
- Wengenack, N. L., M. P. Jensen, F. Rusnak y M. K. Stern (1999). *Mycobacterium tuberculosis* KatG is a peroxynitritase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **256**(3): 485-7.

- Wilson, T. M., G. W. de Lisle y D. M. Collins (1995). Effect of inhA and katG on isoniazid resistance and virulence of *Mycobacterium bovis*. *Molecular Microbiology* **15**(6): 1009-15.
- Xu, X. Q. y S. Q. Pan (2000). An *Agrobacterium* catalase is a virulence factor involved in tumorigenesis. *Molecular Microbiology* **35**(2): 407-14.
- Yamada, Y., T. Fujiwara, T. Sato, N. Igarashi y N. Tanaka (2002). The 2.0 Å crystal structure of catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. *Nature Structural Biology* **9**(9): 691-5.
- Yang, K. S., S. W. Kang, H. A. Woo, S. C. Hwang, H. Z. Chae, K. Kim y S. G. Rhee (2002). Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *Journal of Biological Chemistry* **277**(41): 38029-36.
- Youn, H. D., Y. I. Yim, K. Kim, Y. C. Hah y S. O. Kang (1995). Spectral characterization and chemical modification of catalase-peroxidase from *Streptomyces* sp. *Journal of Biological Chemistry* **270**(23): 13740-7.
- Yun, E. J. y Y. N. Lee (2000). Production of two different catalase-peroxidases by *Deinococcus radiophilus*. *FEMS Microbiology Letters* **184**(2): 155-9.
- Zamocky, M. (2004). Phylogenetic relationships in class I of the superfamily of bacterial, fungal, and plant peroxidases. *European Journal of Biochemistry* **271**(16): 3297-309.
- Zamocky, M., S. Janecek y F. Koller (2000). Common phylogeny of catalase-peroxidases and ascorbate peroxidases. *Gene* **256**(1-2): 169-82.
- Zamocky, M. y F. Koller (1999). Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **72**(1): 19-66.
- Zhang, Y., B. Heym, B. Allen, D. Young y S. Cole (1992). The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* **358**(6387): 591-3.
- Zou, P., I. Borovok, D. Ortiz de Orue Lucana, D. Muller y H. Schrempf (1999). The mycelium-associated *Streptomyces reticuli* catalase-peroxidase, its gene and regulation by FurS. *Microbiology* **145** (Pt 3): 549-59.
- Zou, P. y H. Schrempf (2000). The heme-independent manganese-peroxidase activity depends on the presence of the C-terminal domain within the *Streptomyces reticuli* catalase-peroxidase CpeB. *European Journal of Biochemistry* **267**(10): 2840-9.

BIBLIOGRAFÍA

Abbagnano, Nicola. (1974) *Diccionario de Filosofía*. 2ª ed. (Tr. Alfredo N Galletti). México. F. C. E. 1180 p. p. 102-103, 619-620, 975-976, 990-991.

_____ (1990) *Historia de la Pedagogía*. 9ª ed. México. (Tr. J. Hernández Campos). F. C. E. 709 p. p. 212-216, 246-248, 258-262, 302-308, 320-323, 341-346.

Adler, Alfred. (1985) *El carácter neurótico*. México, Editorial Origen Planeta, Págs. 3-40.

Apuntes personales de los diplomados en desarrollo humano I y II en la Universidad Motolinía del Pedregal.

Branden, Nathaniel. (1987) *Cómo mejorar su autoestima*. Argentina. Paidós. (Tr. Cast. 1994)

(1990) *El respeto hacia uno mismo*. Buenos Aires. Paidós. (Tr. Cast. 1994)

(1993) *El poder de la autoestima: cómo potenciar este importante recurso psicológico*. Argentina. Paidós.

(1999) *Los seis pilares de la autoestima*. Argentina. Paidós. 361 p.

CIMACNOTICIAS. (2004) (Comunicación e información de la mujer) *Hacedoras de la historia. Matilde Montoya, primera mujer médica de México*. Reportaje Realizado por Erika Cervantes, publicado en Internet: www.cimacnoticias.com/noticias/04ene/s04011304.html

Cohn, Jonás. (1962) *Pedagogía Fundamental*. (Tr del alemán por F. Camona Nanclares) Buenos Aires. Losada.

Coll, César. (1992) *Psicología y currículum*. México. Paidós. pp. 39-41.

Coopersmith, Stanley. (1967) *The Antecedents of self-Esteem*. San Francisco, California. W. H. FREEMAN AND COMPANY.

- Coreth, Emerich. (1982) *¿Qué es el hombre? Esquema de una antropología filosófica*. 4ª. ed. (Tr. C. Gancho) Barcelona. Herder, Pp.-55-59
- Chateau, Jean. (1974) *Los Grandes Pedagogos*. (Tr. E. De Champourcin) México, F.C.E., 341 p. pp. 34-51, 111-124, 124-141.
- Delval, Juan. (1994) *El desarrollo humano*. 6ª ed. México. Siglo XXI.
- EDAC (ESTUDIOS DE ADMINISTRACIÓN APLICADA A. C.) (2000) *Cómo ser mujer Integral. Guía de estudio y trabajo*. México. Trillas. (Serie Ser Mujer Hoy, V. I)
- EDAC (ESTUDIOS DE ADMINISTRACIÓN APLICADA A. C.) (1999) *Mujer Integral. El gran acontecimiento de hoy*. 2ª ed. México. Trillas. (Serie Ser Mujer Hoy, V. I)
- EDAC (ESTUDIOS DE ADMINISTRACIÓN APLICADA A. C.) (1997) *Mujer y Educación. La mujer, educadora natural* 2ª ed. México. Trillas. (Serie Ser Mujer Hoy, V. VIII)
- Esparza, Ofelia. (2001) *Aportaciones del desarrollo humano a la práctica educativa*. México. UNAM. Tesina de licenciatura.
- Ferrater Mora, José. (1995) *Diccionario de filosofía abreviado*. México. Sudamericana. p 281-283.
- Field, Lynda. (2000) *60 consejos para elevar la autoestima*. México. Diana.
- Foddis, Walter. (1999) *Sentence Completion and Self-Esteem: Initial Validation of an Assessment Method and Theory*. Canadá. Universidad de Alberta. Tesis.
- Gonzalbo, Pilar. (1985) *El Humanismo y la educación en la Nueva España*. Antología. México. SEP-El Caballito. 159 p. pp. 9-22, 51-64, 125-131, 143-147.
- González Garza, Ana María. *El enfoque centrado en la persona. Aplicaciones a la Educación*. México. Ed. Trillas, 2001. 230 p.
- Gutiérrez Sáenz, Raúl y José Sánchez González. (1975) *Metodología del trabajo Intelectual*. 2ª ed. México. Esfinge.

- Harré Rom; Lamb Roger y colaboradores. (1990) *Diccionario de psicología evolutiva y de la educación. (The Dictionary of Development and Educational Psychology. 1986)* (Tr. Leandro J. Wolfson) (Universidad Autónoma de Barcelona) España. Paidós. 320 p. p. 34-36, 43-45, 51-54, 60-63, 144-147, 154-157, 165-167, 184-191, 212, 217, 229-233, 250, 259-260, 262, 272.
- Hernández Sampieri, R; Fernández Collado, C. & Baptista Lucio, P. (1998) *Metodología De la Investigación. 2ª ed.* México: McGrawHill.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática) (2004). <http://dgcnesyp.inegi.gob.mx/cgi-win/sisesim.exe>
- Jaramillo, Horacio. (1994) *El amor sentido y el sentido del amor.* México. Diana.
- Lara- Cantú, M., Verduzco, M., Acevedo, M., & Cortés, J. (1993) *Validez y confiabilidad del inventario de Coopersmith para adultos en población mexicana.* Revista Latinoamericana de Psicología. México. 25 (2) 247-255.
- Larroyo, Francisco. (1982) *Diccionario Porrúa de Pedagogía.* México. Porrúa. Pág. 39.
- León Portilla, Miguel. (1979) *La filosofía Náhuatl.* 3ª Ed. México. UNAM. pp. 189-200, 221-230.
- López Austin, Alfredo. (1979) *La educación de los antiguos Náhuatl.* México. SEP-El Caballito. Vol. 2, pp. 57-64, 135-149
- Mundi, Salvador. (1985) *La memoria perfecta. Cómo lograrla.* 5ta ed. México. Editorial Pax México.
- Robles, Martha. (1974) *Educación y sociedad en la historia de México.* México. S. XXI pp. 15-25
- Rogers, Carl. (1991) *Libertad y creatividad en la educación: en la década de los Ochentas* 2ª ed. España. Paidós.
- _____ (1972) *Psicoterapia centrada en el cliente.* Buenos Aires. Paidós.
- Romo Azucena. (2001) *Pedagogía de la dignidad vs. Pedagogía de la dependencia.* México. Editorial Torres Asociados.

Satir, Virginia. (1988) *Autoestima*. México. Editorial Pax.

Saavedra R, Manuel S. (2001) *Diccionario de Pedagogía*. Editorial Pax.

Verduzco, M. A., Lara, M. A., Acevedo, M. & Cortés, J. (1994) *Validación del inventario de autoestima de Coopersmith para niños mexicanos*.
Revista Intercontinental de Psicología y Educación. México.
Dic Vol. 7(2), 55-64.

Zavala, Silvio. (1972) *La filosofía política en la conquista de América*.
2ª ed. México. F.C.E.

ANEXOS

ANEXO 1

INVENTARIO DE AUTOESTIMA DE COOPERSMITH VERSIÓN PARA ADULTOS

Nombre _____

Por favor marca sí o no, es muy importante que contestes todos los reactivos.

1.	Generalmente los problemas me afectan muy poco	SI	NO
2.	Me cuesta mucho trabajo hablar en público	SI	NO
3.	Si pudiera cambiaría muchas cosas de mí	SI	NO
4.	Puedo tomar una decisión fácilmente	SI	NO
5.	Soy una persona simpática	SI	NO
6.	En mi casa me enoja fácilmente	SI	NO
7.	Me cuesta trabajo acostumbrarme a algo nuevo	SI	NO
8.	Soy popular entre las personas de mi edad	SI	NO
9.	Mi familia generalmente toma en cuenta mis sentimientos	SI	NO
10.	Me doy por vencida muy fácilmente	SI	NO
11.	Mi familia espera demasiado de mí	SI	NO
12.	Me cuesta mucho trabajo aceptarme como soy	SI	NO
13.	Mi vida es muy complicada	SI	NO
14.	Mis compañeros casi siempre aceptan mis ideas	SI	NO
15.	Tengo mala opinión de mi misma	SI	NO
16.	Muchas veces me gustaría irme de mi casa	SI	NO
17.	Con frecuencia me siento a disgusto en mi trabajo	SI	NO
18.	Soy menos bonita que la mayoría de la gente	SI	NO
19.	Si tengo algo que decir, generalmente lo digo	SI	NO
20.	Mi familia me comprende	SI	NO
21.	Los demás son mejor aceptados que yo	SI	NO
22.	Siento que mi familia me presiona	SI	NO
23.	Con frecuencia me desanimo en lo que hago	SI	NO
24.	Muchas veces me gustaría ser otra persona	SI	NO
25.	Se puede confiar muy poco en mí	SI	NO

ANEXO 2

SLCS

Nombre _____

Indica que tan de acuerdo o no estas con los enunciados de abajo. La escala varia de total acuerdo a total desacuerdo. Lee cada uno de los enunciados abajo y por favor trata de responder honestamente. No hay respuestas correctas o incorrectas.

	Totalmente En Desacuerdo	Desacuerdo	Neutral	De Acuerdo	Totalmente De Acuerdo
1. Debido a mis capacidades tengo mucho potencial	___	___	___	___	___
2. Me siento cómodo conmigo mismo.	___	___	___	___	___
3. No tengo mucho éxito.	___	___	___	___	___
4. Hasta el momento lo he hecho bien en la vida.	___	___	___	___	___
5. Tengo buen desempeño en la mayoría de las cosas	___	___	___	___	___
6. Con frecuencia, es desagradable para mí pensar en mí mismo.	___	___	___	___	___
7. Tiendo a autodevaluarme.	___	___	___	___	___
8. Me concentro en mi fortaleza.	___	___	___	___	___
9. Me siento inútil a veces.	___	___	___	___	___
10. Soy una persona capaz.	___	___	___	___	___
11.No tengo mucho de que sentirme orgulloso.	___	___	___	___	___
12.Me siento seguro en el sentido de mi propio valor.	___	___	___	___	___
13.Me gusto a mi mismo.	___	___	___	___	___
14.No tengo el suficiente respeto hacia mi mismo.	___	___	___	___	___
15.Soy talentoso.	___	___	___	___	___
16.Me siento bien acerca de quien soy.	___	___	___	___	___
17.No soy muy competente.	___	___	___	___	___
18.Tengo una actitud negativa hacia mi mismo.	___	___	___	___	___
19.Manejo precariamente los retos.	___	___	___	___	___
20.Me desempeño inadecuadamente en muchas situaciones importantes.	___	___	___	___	___

ANEXO 3

SESCI

Explicación para el Método de Completar Oraciones

Se le proporciona una serie de oraciones incompletas, o fragmentos de oraciones, y le vamos a pedir completarlas con finales gramaticalmente correctos. Por ejemplo, puede completar el siguiente fragmento de oración, “Cuando yo miro al cielo, yo_”, con finales como:

“veo el cielo azul”

“veo nubes flotando por todos lados,” o

“le pido un deseo a una estrella”

Es importante para este ejercicio completar los fragmentos de oraciones lo más pronto posible. En otras palabras, queremos la primera respuesta que venga a su mente sin ningún tipo de ensayo o de pensamiento previo. Para cada fragmento, por favor responda con seis finales diferentes y gramaticalmente correctos. Si se atora, invente un final. Estos finales inventados pueden ser ilógicos, falsos o simplemente tontos. Es importante mantener el cuestionario en marcha durante el ejercicio. Después de que usted ha terminado la **forma completa** marque estas terminaciones inventadas con una ‘X’.

Cuando este contestando un fragmento de oración, por favor trate de evitar finales de una palabra o dos. Trate de incluir finales específicos y, cuando sea posible, incluya un verbo. En otras palabras, escriba finales que sean **detallados** y **orientados** a una **acción**. Por ejemplo, para el fragmento, “Una cosa que me gusta es-”, una terminación demasiado simple sería “mi coche” o decir “caminar”. Se prefieren finales más detallados y orientados a acciones como, “manejar mi coche en la carretera” o “caminar fuera en un día soleado”. No todas las oraciones incompletas parecen necesitar un verbo y se va a dar cuenta de esto mientras completa los fragmentos de oraciones. Pero siempre que haya posibilidad u oportunidad de incluir un verbo en una acción por favor hágalo.

Le pedimos que trate de escribir seis finales diferentes, pero si se encuentra escribiendo finales similares, no se preocupe. Es más importante la velocidad de la respuesta que escribir finales diferentes. Para ser claro, no hay finales correctos ni incorrectos. Lo que nosotros estamos buscando son sus respuestas personales.

Para que se familiarice con el método, trate de escribir seis finales diferentes para las siguientes oraciones incompletas. Recuerde responder lo más pronto posible e incluir detalles siempre que pueda. Le podrá ayudar repetir la oración incompleta mentalmente antes de cada uno de los finales.

Una cosa en la que pienso durante el día es-

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____

Una cosa que me digo a mi mismo antes de irme a dormir es-

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____

Una nota final: Debido a que este ejercicio fue contestado rápidamente, algunos de sus finales pueden ser confusos o vagos. Si siente que alguno de sus finales fueron confusos, puede regresar y añadir detalles para que los finales tengan más sentido. No es necesario hacer esto para las dos que acabamos de completar, pero es algo que debe tener en mente cuando haya finalizado toda la forma para completar oraciones. Esta instrucción se incluye como un recordatorio al final de la forma.

Forma para completar oraciones

Recuerde evitar respuestas de una o dos palabras y poner tantos detalles como pueda. Mantenga el cuestionario en marcha, inventando finales si tiene que hacerlo. Y si lo tiene que hacer marque con una 'X' estos finales inventados después que haya completado toda la forma.

Me gusto más a mi mismo cuando-

1. _____ ()
2. _____ ()
3. _____ ()
4. _____ ()
5. _____ ()
6. _____ ()

Confío más en mí mismo cuando-

1. _____ ()
2. _____ ()
3. _____ ()
4. _____ ()
5. _____ ()
6. _____ ()

Algo de lo que depende mi sentido de confianza es-

1. _____ ()
2. _____ ()
3. _____ ()
4. _____ ()
5. _____ ()
6. _____ ()

Algo de lo que depende mi sentido de auto-respeto es-

1. _____ ()
2. _____ ()
3. _____ ()
4. _____ ()
5. _____ ()
6. _____ ()

Algo de lo que depende mi sentido de competencia es-

1. _____ ()
2. _____ ()
3. _____ ()
4. _____ ()
5. _____ ()
6. _____ ()

Algo de lo que depende mi sentido de mi propio valor es-

1. _____ ()
2. _____ ()
3. _____ ()
4. _____ ()
5. _____ ()
6. _____ ()

Algo de lo que depende mi sentido de auto-aprobación es-

1. _____ ()
2. _____ ()
3. _____ ()
4. _____ ()
5. _____ ()
6. _____ ()

Debido a que este formato a sido contestado rápidamente alguno de sus finales pueden ser demasiado vagos o generales, por ejemplo, si usted escribió "mi relación con mi papá" como un final, sería útil especificar que quiere decir con "mi relación". Otros ejemplos de respuestas demasiados generales son "las cosas que digo", o "las cosas que hago". Aquí por favor trate de especificar que es lo que usted quiere decir por "las cosas". Al revisar sus finales recuerde marcar únicamente las que tuvo que inventar marcándolas con una X.

Si quieres ponerte en contacto conmigo, puede ser a través de mi correo electrónico:

loborojo@prodigy.net.mx