



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UN/M  
POSGRADO 

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EN BUSCA DE LA FUNCIÓN DE LA  
CATALASA-PEROXIDASA DE  
*NEUROSPORA CRASSA*

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
**MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**  
P R E S E N T A :  
**VANESSA VEGA GARCÍA**



Tutor: DR. WILHELM HANSBERG TORRES

MÉXICO, D. F.

Octubre 2011



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.

# EN BUSCA DE LA FUNCIÓN DE LA CATALASA-PEROXIDASA DE *NEUROSPORA CRASSA*

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Wilhelm Hansberg Torres en el Departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Wilhelm Hansberg Torres	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. María Brenda Valderrama Blanco	Instituto de Biotecnología, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica del Dr. Pablo Rangel Silva en los experimentos de purificación de la enzima.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (CB50716). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día de Octubre de 2011

El Jurado de Exámen estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Alejandra Covarrubias Robles	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dra. María Brenda Valderrama Blanco	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química, UNAM
Suplente	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente	Dr. Felipe Cruz García	Facultad de Química, UNAM

## **CONTENIDO**

Carátula  
Reconocimientos  
Agradecimientos  
Índice  
Abreviaturas  
Resumen  
Introducción  
Objetivos  
Materiales y Métodos  
Resultados  
Discusión  
Conclusiones  
Perspectivas  
Referencias  
Anexos

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
La diferenciación celular en el hongo <i>Neurospora crassa</i>	<b>8</b>
La tensión oxidante y la diferenciación celular	<b>11</b>
Las especies reactivas de oxígeno y la respuesta antioxidante	<b>12</b>
Las catalasas y las hemoperoxidasas	<b>13</b>
Las catalasa-peroxidadas	<b>15</b>
El mecanismo catalítico de las catalasa-peroxidadas	<b>15</b>
La estructuración de los aminoácidos del sitio catalítico de las catalasa-peroxidadas	<b>16</b>
Las catalasa-peroxidadas de los hongos	<b>19</b>
La catalasa-peroxidasa de <i>Neurospora crassa</i>	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
<b>RESULTADOS</b>	
I. <u>Caracterización fenotípica de la cepa carente de <i>cat-2</i></u>	
I.1. La conidiación sumergida en las cepas sin <i>cat-2</i>	<b>38</b>
I.2. La cepa $\Delta cat-2$ produce más conidios aéreos que la cepa silvestre	<b>40</b>
I.3. La acumulación de los carotenos en condiciones de crecimiento restringidas de carbono	<b>41</b>
I.4. Medición del contenido de carbonilos en la proteína total	<b>42</b>
I.5. El crecimiento de la cepa $\Delta cat-2$	<b>43</b>
II. <u>Mutantes monofuncionales de CAT-2</u>	
II.1. Integración dirigida de <i>cat-2</i> y <i>cat-2W90A</i>	<b>44</b>
II.2. La acumulación de ARNm de <i>cat-2</i> en las cepas transformadas con <i>cat-2</i> y <i>cat-2W90A</i>	<b>47</b>
II.3. La actividad de catalasa y de peroxidasa de la CAT-2 en las cepas transformadas con <i>cat-2</i> y con <i>cat-2W90A</i>	<b>47</b>
II.4. La actividad de catalasa y de peroxidasa de la CAT-2 en cultivos que han crecido en metanol	<b>48</b>
II.5. La acumulación de la CAT-2 en las cepas transformadas con <i>cat-2</i> y <i>cat-2W90A</i>	<b>49</b>
II.6. Purificación de la CAT-2 expresada en <i>E. coli</i>	<b>50</b>
II.7. La expresión del gen <i>cat-2W90A</i> en <i>E. coli</i>	<b>51</b>
II.8. Análisis de las actividades de catalasa y de peroxidasa en la mutante CAT-2W90A expresada en <i>E. coli</i>	<b>52</b>
II.9. La mutante CAT-2W90A sí incorpora hemo	<b>53</b>
II.10. La mutante R426 genera una enzima monofuncional	<b>54</b>
III. <u>Determinación del aducto covalente W-Y- M en la CAT-2</u>	<b>55</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>66</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>66</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>68</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO</b>	<b>73</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

CP	catalasa/peroxidasa
TA	temperatura ambiente
HEPES	ácido N'-2-etanosulfónico
SDS	dodecil sulfato de sodio
PMSF	fluoruro de fenil metil sulfonilo
TEMED	N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamina
p/v	peso sobre volumen
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
IPTG	isopropil $\beta$ -tiogalactósido
wt	cepa silvestre
ALA	ácido $\delta$ -aminolevulínico
rpm	revoluciones por minuto
pb	pares de bases
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
Ni-NTA	níquel- ácido nitrilo-acético
Nal <sup>s</sup>	sensibilidad al ácido nalidíxico
Str <sup>s</sup>	sensibilidad a la estreptomycin
Rif <sup>s</sup>	sensibilidad a la rifampicina
Thi <sup>-</sup>	auxótofa para tiamina y tiazol
Lac <sup>-</sup>	cepa auxótofa para lactosa
Ara <sup>+</sup>	cepa protótofa para arabinosa
Gal <sup>+</sup>	cepa protótofa para galactosa
Mtl <sup>-</sup>	cepa auxótofa para manitol
F <sup>-</sup>	cepa carente de factor F (fertilidad)
RecA <sup>+</sup>	cepa con capacidad para recombinar
Uvr <sup>+</sup>	cepa con capacidad para repara los daños al ADN de la luz ultravioleta
Lon <sup>+</sup>	cepa que puede lisogenizar
TLCK	hidrocloruro de N $\alpha$ -Tosil-L-lisina
	clorometil cetona

## RESUMEN

Las catalasas monofuncionales, las peroxidasas y las catalasa/peroxidasas (CP) son enzimas que están involucradas en los mecanismos de defensa contra el peróxido de hidrógeno. De estas enzimas sólo las CP son bifuncionales: tienen actividad tanto de catalasa como de peroxidasa. Las CP únicamente se han encontrado en bacterias, en arqueas y en hongos.

Las CP bacterianas han suscitado considerable interés por el papel que tienen en la activación de la pro-droga isoniazida (INH), el antibiótico usado para tratar la tuberculosis. De ahí surge la importancia en estudiar con detalle tanto el mecanismo catalítico de la enzima, como su función dentro de la célula (Ghiladi *et al.*, 2004). La gran mayoría de estudios se han realizado estudiando las enzimas bacterianas, mientras que las CP en hongos se han estudiado parcialmente.

Nuestro estudio se basa en encontrar la función de la catalasa/peroxidasa (CAT-2) de *Neurospora crassa*. Para cumplir con este objetivo analizamos los efectos que tiene la ausencia del gen *cat-2* que codifica para la CAT-2, en la producción de conidios, que es una condición en la que se induce la actividad de esta enzima. Los resultados encontrados mostraron que la cepa mutante nula en el gen *cat-2* ( $\Delta cat-2$ ) tuvo una tendencia a formar una mayor cantidad de esporas asexuales (conidios) y a la agregación de las hifas en condiciones de cultivo líquido que la cepa silvestre. En estas condiciones la producción de otros sistemas antioxidantes como los carotenos y la oxidación de proteínas en la cepa  $\Delta cat-2$  fue similar a la de la cepa silvestre,

La diferencia significativa entre la cepa  $\Delta cat-2$  y la cepa silvestre está en la producción de conidios en condiciones de cultivo sólido (conidiación aérea). Debido a que la CAT-2 es una enzima bifuncional para saber si el fenotipo de conidiación está relacionado con su actividad de catalasa o con su actividad de peroxidada generamos mutantes del gen *cat-2* en dos aminoácidos que se sabe cancelan la función catalítica de catalasa en las CP. La sustitución del triptófano 90 por una alanina en el gen *cat-2* tuvo el efecto esperado cuando se expresa en *Escherichia coli* pero en *N. crassa* generó un producto que no es posible traducir o que se traduce y se degrada. La sustitución de la arginina 426 por una alanina expresada en

*E. coli* también generó una CAT-2 monofuncional sin la actividad de catalasa con una migración electroforética similar al de la enzima silvestre expresada en *E. coli*.

Por otra parte, empleando la CAT- 2 recombinante se determinó que el aducto covalente W-Y-M de la cavidad distal del hemo, encontrado en las CP bacterianas, también está presente en la enzima de *Neurospora crassa*. Este es el primer reporte en el que se confirma la presencia de este aducto covalente en una CP de hongos. Concluyendo, la función de la CAT-2 está relacionada con la producción de la conidiación aérea, su función podría ser compensada por las otras catalasas del hongo que evitan que aún en ausencia de la CAT-2 la cepa  $\Delta cat-2$  se encuentre estresada. Además, con los resultados encontrados en este trabajo, se apoya la idea de que las mismas relaciones estructurales y funcionales encontradas en las CP bacterianas podrían ser aplicadas para la enzima de *Neurospora*. La expresión de la CAT-2 en *E. coli* y su purificación permitirá determinar la estructura de la enzima y conocer a detalle el mecanismo catalítico de la CAT-2, que sería la primera CP de hongos estudiada a ese nivel.

## I. INTRODUCCIÓN

### La diferenciación celular en el hongo *Neurospora crassa*

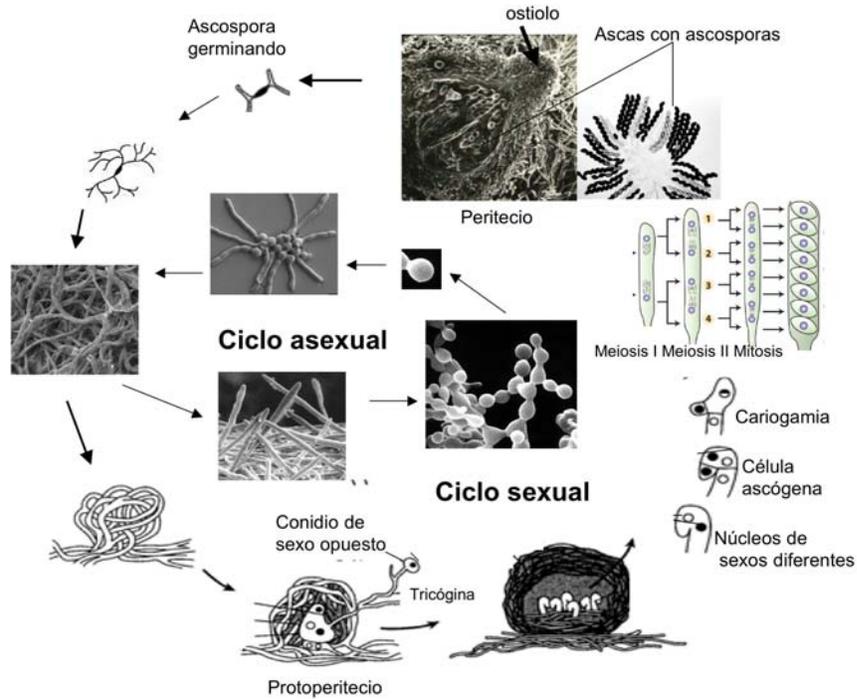


**Figura 1.** *N. crassa* creciendo sobre un tallo de caña de azúcar. Presenta un característico color naranja debido a que sintetiza carotenos (Raju, 1980)

*Neurospora crassa* es un hongo filamentoso (Figura 1) que pertenece al Filo Ascomycota, clase de los *Ascomycetes*. Es ubicuo aunque se encuentra principalmente en las áreas tropicales y subtropicales y en lugares que tienen conexión con actividades agrícolas. Es uno de los primeros colonizadores de los bosques incendiados y se ha utilizado como organismo experimental desde 1920. Como modelo biológico ha contribuido al conocimiento de diversos procesos, entre ellos, la genética y la diferenciación celular (Davis, 2000). El genoma de *N. crassa* está secuenciado y se cuenta con gran cantidad de cepas mutantes afectadas en el metabolismo o en la diferenciación celular (Borkovich *et al.*, 2004; Galagan *et al.*, 2003).

*N. crassa* produce diferentes tipos celulares, muchos de los cuales se derivan de las células somáticas denominadas hifas (Bistis, 2003). Las hifas son filamentos que crecen en las puntas y que se van ramificando por la capacidad de formar nuevos ápices de crecimiento. Las hifas presentan compartimentos multinucleados delimitados por septos que tienen un poro central por el cual pasan los organitos celulares y los núcleos.

*N. crassa* tiene dos fases reproductivas, una asexual y otra sexual (Figura 2). El proceso de formación de las esporas asexuales, llamadas conidios, comprende tres transiciones morfogénicas: las hifas en crecimiento se adhieren y a partir del micelio adherido se desarrollan hifas aéreas especializadas. Estas se ramifican y posteriormente forman los conidios en sus puntas. Los conidios se dispersan y germinan en un medio con nutrientes para formar nuevamente las hifas (Springer y Yanofsky, 1992; Hansberg, 1996). El proceso de conidiación del hongo se puede inducir por estímulos tales como el aire (Toledo, 1986) o la luz (Davis, 2000). Asimismo, se sabe que la privación de carbono o de nitrógeno puede inducir la formación de conidios aún en cultivos sumergidos (Muller, 1989).



**Figura 2. Ciclo de vida de *N. crassa***  
 Modificado de (Harris *et al.*, 1975)

*N. crassa* es un hongo heterotálico en el cual la reproducción sexual sólo ocurre entre organismos de sexo distinto determinados genéticamente por los loci *mat-A* y *mat-a*. Una cepa de cualquiera de los dos sexos puede funcionar como receptora (femenina) o como donadora (masculina) para la formación de las esporas sexuales. Este proceso se induce en un medio limitado en la fuente de nitrógeno. Bajo estas condiciones se forma el ascogonio (o gameto femenino) el cual se cubre por hifas vegetativas generando una estructura denominada protoperitecio. El ascogonio forma hifas especializadas llamadas tricóginas que se guían mediante feromonas y crecen hacia las células del otro sexo. La tricógina se fusiona con la célula del otro sexo y los núcleos masculinos migran a lo largo de la hifa tricógina hasta el ascogonio. En el ascogonio se replican los núcleos de ambos sexos para luego formar las hifas ascógenas que tienen núcleos femeninos y masculinos. El protoperitecio crece y se cubre con otras hifas formando una estructura en forma de pera llamada peritecio. Cada una de las hifas ascógenas dentro del peritecio forma un gancho en la punta y luego se septa para formar una célula que contiene dos núcleos, uno de cada sexo. Esta célula formará el saco o asco que albergará las

ascosporas. Los núcleos de la célula se fusionan (cariogamia) para formar la única célula diploide en el ciclo de vida del hongo. Después de la cariogamia se lleva a cabo las dos divisiones meióticas seguidas de una división mitótica, por lo que se forman ocho ascosporas haploides dentro del asco. Una vez formadas las ascosporas, éstas salen disparadas por el orificio (ostiolo) que se encuentra en la punta del peritecio (Raju, 1980).

### **La tensión oxidante y la diferenciación celular**

En el laboratorio del Dr. Hansberg estamos interesados en estudiar los procesos de diferenciación celular. Utilizamos *N. crassa* como modelo experimental ya que es un hongo no patógeno que crece rápido en un medio definido, sus procesos de diferenciación celular ocurren en poco tiempo, el asexual en un día y el sexual en varios, y se pueden inducir. Los estadios diferenciados de la esporulación asexual se forman a tiempos precisos, se separan con facilidad y se pueden obtener en cantidad suficiente para realizar un análisis bioquímico.

Utilizando este modelo experimental se descubrió que, al inicio de cada una de las transiciones morfogenéticas del proceso de conidiación, hay un estado hiperoxidante que se caracteriza por: a) el incremento en la oxidación de las proteínas en general y de enzimas específicas, como la sintetasa de glutamina, la deshidrogenasa de glutamato dependiente del NADPH y las catalasas (Hansberg, 1996; Michan *et al.*, 2002), b) la pérdida del poder reductor celular (Hansberg, 1996; Toledo *et al.*, 1991), c) la detección de la quimioluminiscencia producida por algunas especies del oxígeno reactivas (Hansberg *et al.*, 1993) y d) los cambios en los mecanismos antioxidantes como la inducción de las catalasas (Michan *et al.*, 2002) y la producción de los carotenos (Hansberg W., Stahl, Sies, H., datos sin publicar). Además, al inicio de la germinación de los conidios también se genera un estado hiperoxidante en el cual se detecta la producción de oxígeno en singulete (Lledias *et al.*, 1998).

Uno de los principales temas de estudio en el laboratorio son los mecanismos antioxidantes del hongo, específicamente las catalasas. *N. crassa* tiene cuatro catalasas, denominadas CAT-1, CAT-2, CAT-3 y CAT-4. De éstas la CAT-3 y la CAT-

1 se han cristalizado y se conoce con detalle su estructura tridimensional (Diaz *et al.*, 2004; Diaz *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha analizado su expresión durante el ciclo de vida del hongo (Michan *et al.*, 2002) y se ha determinado el efecto de la ausencia de la CAT-3 en la conidiación y en la diferenciación sexual del hongo (Michan *et al.*, 2003). Sin embargo, hasta ahora no se conoce con detalle la función de la CAT-2 y la CAT-4.

### **Las especies reactivas del oxígeno y la respuesta antioxidante**

Las especies del oxígeno reactivas (EOR) son moléculas derivadas del oxígeno que son más reactivas que éste en su estado basal. Las EOR incluyen radicales del oxígeno tales como el alcoxilo ( $\text{RO}\cdot$ ), el hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ), el peroxilo ( $\text{HO}_2\cdot$ ) y el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) así como especies, que no son radicales, como el ozono ( $\text{O}_3$ ), el oxígeno en singulete ( $^1\text{O}_2$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Muchas de estas EOR se forman en la célula. El lugar en donde se produce la mayor cantidad de EOR es en la mitocondria. La generación del anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) ocurre principalmente en los complejos I y III de la cadena respiratoria (Inoue *et al.*, 2003; Nohl *et al.*, 2005). El  $\text{O}_2^{\cdot-}$  es también producido por enzimas como la oxidasa de la xantina o la del NADPH y de forma no enzimática por radiaciones  $\gamma$  y ultravioleta (Kamata y Hirata, 1999).

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  se forma por dismutación del  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Esta dismutación puede ocurrir de manera espontánea, particularmente a bajo pH, o por la acción de la enzima superóxido dismutasa. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  también se puede producir por enzimas como las oxidasas de xantina, de azúcares, de aminoácidos, del glicolato, del ácido úrico, o bien con las enzimas implicadas en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos (Dalton *et al.* 1999). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  se puede producir dentro o fuera de la célula y entrar a ésta a través de las acuaporinas o atravesando las membranas celulares. Pese a que se considera que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es menos reactivo que otras ERO, es capaz de inactivar directamente algunas enzimas. Entre los mecanismos propuestos para explicar dicha inactivación están la S-tiolación (Shenton and Grant, 2003), la carbonilación (Cabiscol *et al.*, 2000); Costa *et al.* 2002) y la ADP-ribosilación (Colussi *et al.*, 2000). La S-tiolación de proteínas y la carbonilación son los mecanismos más estudiados.

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede reaccionar con iones de metales de transición como el Fe<sup>2+</sup> o el Cu<sup>+</sup> formando el radical hidroxilo, el cual es muy reactivo y puede reaccionar casi con cualquier molécula biológica: azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, ADN y ácidos orgánicos (Halliwell, 1999).

La eliminación del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es uno de los principales mecanismos antioxidantes que permiten a la célula evitar que se formen otras ERO más reactivas como el radical hidroxilo. Dicha eliminación es llevada a cabo por la superóxido dismutasa, en el caso del primero, y por las catalasas, las peroxidasas - principalmente la catalasa/peroxidasa, las glutatión peroxidasas y citocromo c peroxidasa - y las peroxirredoxinas, en el caso del segundo.

Las células contienen además una variedad de sustancias que ayudan a contrarrestar los daños producidos por las ERO. Algunas de estas sustancias son: el glutatión, la vitamina C (ascorbato), la vitamina E (α-tocoferol), los carotenos, los tioles y el urato. (Droge, 2002; Sauer *et al.*, 2001). El NAD(P)H y el glutatión en conjunción con la tioredoxina y glutarredoxina son los principales reductores celulares y están presentes prácticamente en todos los seres vivos.

### **Las catalasas y las hemoperoxidasas**

Las catalasas son enzimas que dismutan el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> directamente en O<sub>2</sub> y dos moléculas de agua:



Estas enzimas están formadas por 4 subunidades idénticas, cada una conteniendo un grupo hemo. Algunas catalasas son muy resistentes a los agentes desnaturizantes y a los solventes orgánicos (Diaz *et al.*, 2004). Las catalasas tienen un origen en común y están presentes en organismos de los tres dominios de seres vivos: Arquea, Eubacteria y Eucariota (Diaz *et al.*, 2005; Klotz and Loewen, 2003). Filogenéticamente, las catalasas se agrupan en tres clados: los grupos 1 y 3 que corresponden a las catalasas de subunidad pequeña, con una masa de 55 a 69 kDa, y el grupo 2 que corresponde a las catalasas de subunidad grande, cuya masa va de los 75 a los 86 kDa (Diaz *et al.*, 2009).

Las peroxididasas son un grupo extenso y heterogéneo de enzimas que se encargan de catalizar la reducción de los peróxidos, entre ellos el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las hemoperoxidasas utilizan el hemo como grupo prostético. Otras peroxididasas usan átomos de vanadio o de selenio y algunas usan residuos de cisteínas en su mecanismo de reacción.

Las hemoperoxidasas se dividen en dos grandes superfamilias, la de animales y la de plantas, hongos y bacterias. Esta última superfamilia se ha dividido además en tres clases (clase I, II y III) de acuerdo con su localización celular y su función (Welinder, 1992). Así, la citocromo *c* peroxidasa, la ascorbato peroxidasa y la catalasa/peroxidasa pertenecen a la clase I; la lignina-peroxidasa y las peroxididasas de manganeso pertenecen a la clase II y las peroxididasas de secreción de las plantas con cuatro puentes disulfuro conservados y una unión a Ca<sup>2+</sup>, como la peroxidasa de raíz fuerte, pertenecen a la clase III.

### **Las catalasa/peroxididasas**

Las catalasa/peroxididasas (CP) son enzimas bifuncionales que pueden llevar a cabo de manera eficiente la actividad de catalasa y la actividad de peroxidasa. Son hemoproteínas diméricas; sin embargo, se han reportado enzimas tetraméricas y monoméricas (Paris *et al.*, 2003). Las CP se encuentran en las arqueas, en las bacterias y en los hongos (Welinder, 1991) y recientemente se han reportaron en algunos protistas (*Heterocapsa triquetra*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira pseudonana*, varias especies de *Phytophthora*, *Karenia brevis* y en *Chlamydomonas reinhardtii*) (Passardi *et al.*, 2007).

Hasta el momento se reportan 360 secuencias de CP, todas ellas similares a la de las hemoperoxidasas, como la citocromo *c* peroxidasa de hongos y las ascorbato peroxididasas de plantas, y por ello se les reconoce como miembros de la clase I de la superfamilia de peroxididasas de plantas, hongos y bacterias (Welinder, 1992). Las CP son las únicas enzimas de este grupo que poseen una actividad de catalasa elevada (Zamocky, 2004).

Además de su actividad de catalasa y de peroxidasa algunas CP como la de *Burkholderia pseudomallei* y la de *Mycobacterium tuberculosis* son capaces de llevar

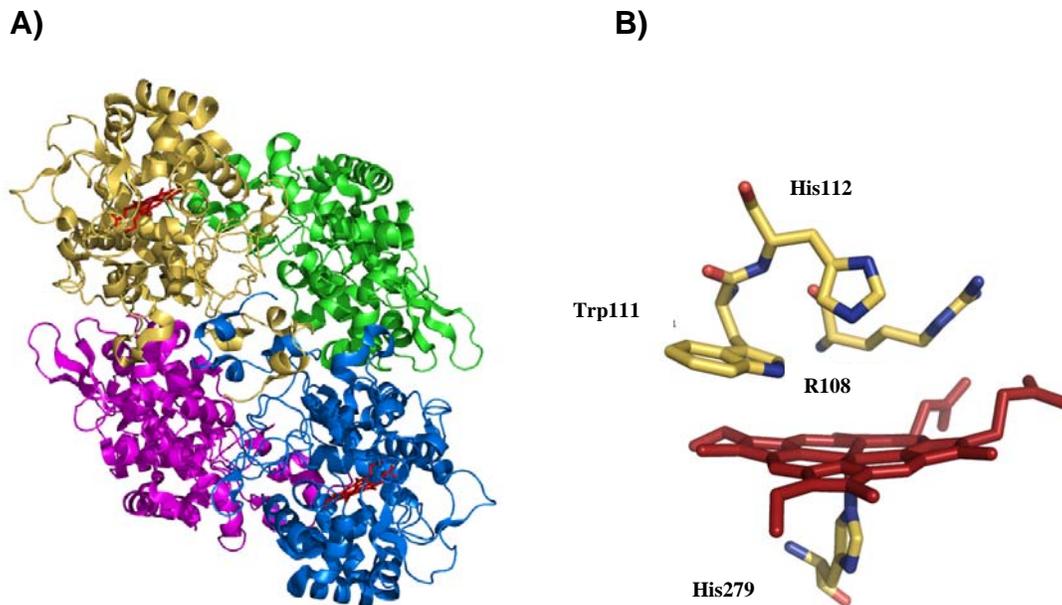
a cabo otro tipo de reacciones de oxido-reducción. Por ejemplo, pueden oxidar lentamente el NADH y también la hidrazida del ácido isonicotinoilo también conocida como isoniazida. La isoniazida se utiliza como droga contra el bacillus *M. tuberculosis* y su forma activa es el isonicotinoilo del NAD. La formación de este compuesto involucra la eliminación de la hidrazina de la isoniazida por la CP y la unión del grupo isonicotinoilo con el NAD. El papel central de la CP en la activación de la isoniazida se evidencia con el aislamiento de cepas de *M. tuberculosis* que son resistentes a la isoniazida debido a mutaciones que inactivan la CP y también con los estudios bioquímicos que han mostrado un papel directo de la CP en la generación del derivado isonicotinoilo (Johnsson K., 1995; Singh *et al.*, 2004, Wiseman, *et. al*, 2010).

La secuencia de las CP sugiere que el gen es el resultado de un evento de duplicación de un gen de peroxidasa y su fusión posterior (Welinder, 1991; Zamocky, 2004). Así las CP están compuestas por dos mitades que son semejantes entre sí y que también son semejantes a la citocromo c peroxidasa. Además, las CP contienen cerca de 730 aminoácidos y las hemo-peroxidasas de hongos y plantas alrededor de 320 aminoácidos (Welinder, 1991).

Actualmente se cuenta con la estructura cristalográfica de cuatro CP: la CP de *Haloarcula marismortui* (1ITK) (Yamada *et al.*, 2002), la de *B. pseudomallei* (1MWV) (Carpena *et al.*, 2003), la de *M. tuberculosis* (1SJ2) (Bertrand *et al.*, 2004b) y la de *Synechococcus* PCC7942 (1UB2) (Wada *et al.*, 2002).

Las CP tienen un dominio N-terminal que une el grupo prostético hemo y un dominio C-terminal sin grupo prostético (Figura 3). Aunque el dominio C-terminal carece del grupo hemo, conserva la arquitectura del sitio activo, incluyendo varios de los aminoácidos que están presentes en los lados proximal y distal de la cavidad del hemo del dominio N-terminal. Las excepciones son las sustituciones de la histidina distal por una Ala 486 y de la histidina proximal por una Leu 630 (la numeración corresponde a la enzima de *N. crassa*) que evitan la unión del hemo. Se ha descrito que el dominio C-terminal es esencial para estructurar el centro activo en el dominio N-terminal, contribuyendo así a la estructura que permite la actividad bifuncional de

la CP (Baker *et al.*, 2006), aunque no se entienden totalmente las consecuencias funcionales de esta estructura de dos dominios.



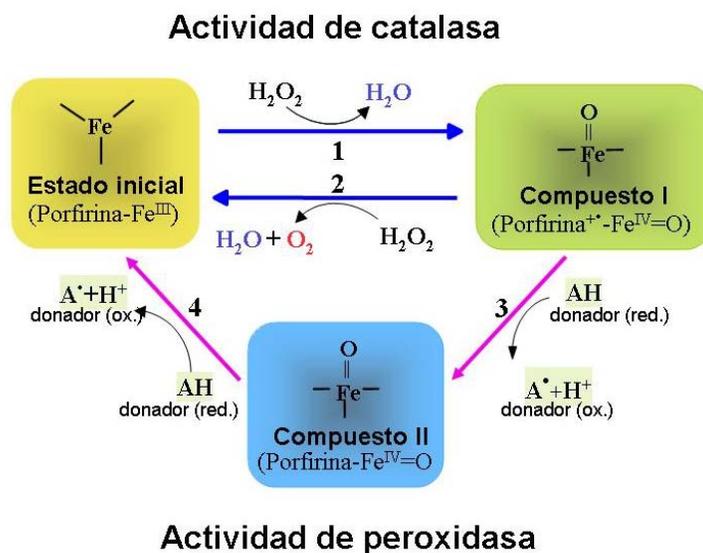
**Figura 3. Dominios N- y C-terminales en la estructura de la CP de *B. pseudomallei***

**A)** Vista del dímero. Los dominios N- y C-terminales de la subunidad 1 se muestran en azul y magenta, respectivamente, mientras que los de la subunidad 2 se muestran en amarillo y verde. El hemo b se muestra representado en rojo. **B)** Residuos importantes para la actividad de la enzima en la cavidad del hemo. El modelo se hizo utilizando el programa PyMOL.

### **El mecanismo catalítico de las CP**

Las CP son enzimas capaces de reducir el  $\text{H}_2\text{O}_2$  usando un agente reductor externo (actividad de peroxidasa) y también de dismutarlo en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$  (actividad de catalasa) (Long y Salin, 2000). En ambas reacciones el primer paso de la reacción es el mismo y consiste en la oxidación del hemo. El enlace entre los oxígenos del peróxido se rompe cuando uno de los oxígenos capta dos electrones, en seguida se protona y se libera como molécula de agua. El otro átomo de oxígeno se coordina con el hierro del hemo formando el compuesto I, ( $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ) y un radical catiónico, que puede ser porfirínico, de un aminoácido vecino o una mezcla de ambos. El siguiente paso consiste en la reducción del compuesto I.

En la reacción de catalasa la reducción del compuesto I se lleva a cabo mediante una transferencia de dos electrones de una segunda molécula de peróxido de hidrógeno (Figura 4, reacción 2). En la reacción de peroxidasa se utiliza un donador de electrones diferente al peróxido de hidrógeno. Este donador transfiere un solo electrón en dos reacciones secuenciales (Figura 4, reacciones 3 y 4). Así, se genera una segunda forma intermediaria de la enzima que se llama compuesto II, en la que la enzima está parcialmente reducida, pues sólo el radical catiónico se ha reducido a su estado inicial. La reacción termina cuando una segunda molécula del donador reduce el compuesto II, con lo cual la enzima regresa a su estado férrico (Fe III) (Carpena *et al.*, 2006; Hillar *et al.*, 2000; Zamocky *et al.*, 2001). En las CP la reacción de peroxidasa ocurre en condiciones en las que hay una baja concentración de peróxido de hidrógeno y está presente un donador de electrones apropiado (Hillar *et al.*, 2000).



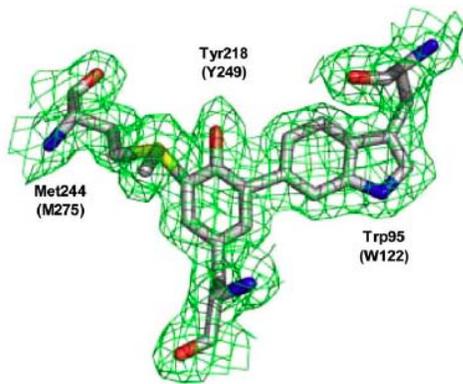
**Figura 4. Esquema de la reacción de catalasa y de peroxidasa**

Ambas actividades involucran la oxidación del grupo hemo para formar el compuesto I (reacción 1). Una segunda molécula de peróxido de hidrógeno puede reducir el compuesto I y formar agua y dióxígeno (actividad de catalasa, reacción 2). La reducción del compuesto I en la reacción de peroxidasa utiliza un donador de electrones diferente al peróxido de hidrógeno y ocurre en dos pasos (reacciones 3 y 4). Esquema modificado de Zamocky *et al.*, 2001.

## La estructuración de los aminoácidos del sitio activo de las CP

En las CP la triada His/Arg/Trp (His123, Arg119, Trp122 en la CP de *Synechocystis*) se encuentra conservada en el lado distal de la cavidad del hemo. De estos residuos, la histidina y la arginina están conservados en el 100% de las secuencias de peroxidasas de la clase I y se ha demostrado que ambos residuos son necesarios para la heterólisis del enlace oxígeno-oxígeno del peróxido de hidrógeno. Por su parte, el triptofano está conservado en el 100% de las secuencias pero solo de las CP (Zamocky *et al.*, 2001). Algunos estudios de mutagénesis demostraron la importancia que tienen estos aminoácidos para el mecanismo catalítico de las CP. La sustitución de la arginina o de la histidina en la CP de *E. coli* (Zamocky *et al.*, 2001), en la de *Synechocystis* PCC6803 (Regelsberger *et al.*, 2000) y en la de *M. tuberculosis* (Rouse *et al.*, 1996) resultó en una reducción de la velocidad de formación del compuesto I y como consecuencia en la actividad de catalasa y de peroxidasa. Sin embargo, la sustitución del triptofano no interfiere en la formación del compuesto I pero es esencial para la reducción del mismo por una segunda molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Deemagarn *et al.*, 2007). Así, las mutantes de triptofano pierden completamente la actividad de catalasa pero retienen la actividad de peroxidasa y en ocasiones esta actividad se incrementa. Esto indica que dicho residuo es indispensable para la actividad de catalasa, pero no para la actividad de peroxidasa.

Se ha visto también que el triptofano forma un aducto covalente con otros dos aminoácidos conservados en el lado distal de la cavidad del hemo: una tirosina y una metionina (Trp122, Tyr249 y Met275 en *Synechocystis*, Figura 5). La sustitución del triptofano o de la tirosina impiden la formación del enlace, mientras que el intercambio de la metionina no impide que se forme el enlace entre el triptofano y la tirosina (Ghiladi *et al.*, 2005c; Jakopitsch *et al.*, 2003a). La sustitución de la metionina o de la tirosina, también inhiben la actividad de catalasa sin afectar la actividad de peroxidasa (Ghiladi *et al.*, 2005c; Jakopitsch *et al.*, 2003a; Jakopitsch *et al.*, 2004). Este aducto covalente es una peculiaridad estructural de las CP y se ha propuesto que una dos asas que cubren el acceso al canal del sitio activo en la superficie de la enzima (Yamada *et al.*, 2002).



**Figura 5. El aducto covalente W-Y-M de las catalasa/peroxidada.**

Se muestra el mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  en verde y el modelo de los residuos. Las figuras se construyeron usando PyMol (Tomado de (Smulevich *et al.*, 2006)

En el extremo proximal de la cavidad del hemo se conserva la triada de aminoácidos His/Trp/Asp (His290, Trp341 y Asp402 en *Synechocystis*). La histidina distal forma el quinto enlace con el hierro del grupo hemo. La sustitución de cualquiera de estos residuos resulta en una actividad de catalasa menor al 1% de la enzima silvestre, a excepción de la variante W341F, en la que se detectó una actividad de catalasa del 40% y un incremento en la actividad de peroxidasa (Jakopitsch *et al.*, 2002).

Hay otros aminoácidos conservados en el lado distal del hemo que juegan un papel importante en el mecanismo catalítico de las CP (Figura 4B). Tal es el caso del Asp152 y de la Ser335 en *Synechocystis* que están en la entrada del canal de acceso al sitio activo. Estos residuos controlan el acceso a los residuos His/Arg/Trp del sitio activo. La sustitución del aspartato reduce la actividad de catalasa pero no tiene efecto sobre la actividad de peroxidasa (Jakopitsch *et al.*, 2003b). La sustitución D152E tiene un efecto ambivalente: dificultan la unión del peróxido para la formación del compuesto I, pero facilita la unión del peróxido para la reducción catalítica del compuesto I.

En la CP de *B. pseudomallei* una sustitución de la arginina distal restaura la actividad de catalasa de la mutante del aspartato (Deemagarn *et al.*, 2007). Ambos residuos compiten por el  $H_2O_2$  que entra al sitio activo, uno se utiliza preferentemente para formar el compuesto I y el otro para la reducción del mismo.

Otro residuo cuya sustitución tiene el efecto de cancelar la actividad de catalasa sin afectar la actividad de peroxidasa es la Arg426 en la CP de *B. pseudomallei*, cuya cadena lateral cambia de conformación en respuesta a los cambios de pH. Se ha observado dos conformaciones en la cadena lateral de la Arg426, una en la que se encuentra disociada de la Tyr238 que se denomina conformación R y otra en la que está asociada a la Tyr 238 que se denomina conformación Y. El equilibrio de las conformaciones R y Y de la cadena lateral de la Arg426 es sensible al pH (Carpena, 2005). A bajo pH, cuando la Arg426 gira a la conformación R, se favorece la oxidación del hemo al compuesto I, facilitando el proceso como peroxidasa, mientras que a alto pH, cuando la Arg426 gira a la conformación Y, se facilita la reducción catalítica del compuesto I por dos electrones por peróxido de hidrógeno. La correlación entre las conformaciones de la Arg426 y el pH podría explicar la diferencia en el pH óptimo para la reacción de peroxidasa (pH 4.5) y de catalasa (pH 6.5) (Singh *et al.*, 2004).

Otra particularidad de las CP son tres asas largas, dos de ellas, las denominadas LL1 y LL2, que tienen una secuencia muy conservada y que restringen el paso del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al sitio activo. El LL1 está ubicado entre las llamadas hélices D y E y conecta los dominios catalíticos del dímero. También controla la flexibilidad y el carácter del enlace covalente entre la histidina y el Fe III. En este asa se encuentra la tirosina que forma el enlace covalente (Jakopitsch *et al.*, 2005).

### **Las catalasa/peroxidasas en los hongos**

El número de las CP de hongos descritas ha ido aumentando recientemente. Se piensa que las CP de los hongos tienen un origen procariote, como consecuencia de un evento de transferencia horizontal (Peraza, 2005); (Klotz y Loewen, 2003) (Zamocky *et al.*, 2010). En concordancia, la mayoría de los genes de CP de hongos no tienen intrones. Se han encontrado organismos con dos genes de CP, como en *Magnaporthe grisea*, *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium oxysporum*, *Grosmannia clavigera*, *Gaeumannomyces graminis*, *Gibberella moniliformis*, *Gibberella zeae*, *Hypocrea jecorina*, *Nectria haematococca*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma*

*virens*, *Verticillium albo-atrum* y *Verticillium dahliae* cuyo origen es parálogo (Zamocky *et al.*, 2009b).

Dentro del grupo de las CP de hongos se distinguen dos grandes grupos. El grupo 1 comprende tanto hongos patógenos como no patógenos incluyendo *Ustilago maydis*, el único representante del grupo de los basidiomicetos que tiene un gen de CP. Un aspecto interesante es que todos los miembros del grupo 1 son enzimas intracelulares, mientras que todos los miembros del grupo 2 tienen una secuencia de secreción en el extremo N-terminal. Esta secuencia se encuentra también en algunas CP de bacterias pero no en las de bacteroides, las cuales están cercanas filogenéticamente a las CP de hongos.

Otro hecho relevante es que sólo los hongos patógenos de plantas conservan genes de ambos grupos. Es posible que estos dos grupos sean consecuencia de un evento de duplicación anterior a la divergencia de los ascomicetos y los basidiomicetos lo que explicaría por qué los hongos como *Magnaporthe grisea* y *Gibberella zeae* conservaron ambas copias y otros perdieron una (p. ejem: *N. crassa*). Otros hongos tuvieron que haber perdido ambas copias (p. ejem.: *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Coprinus cinereus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Cryptococcus neoformans* y *Candida sp.*). No se han descrito CP en quitridiomycetos ni en los mucorales. Por ello se propone que las CP fueron adquiridas por el ancestro común de los ascomicetos y los basidiomicetos (Zamocky *et al.*, 2010).

Las secuencias de CP de los hongos tienen 45-69% de identidad con las secuencias de las CP de bacterias. La identidad entre las secuencias de los hongos es del 80% (Pongpom *et al.*, 2005). El alineamiento múltiple de las secuencias indica que a lo largo de la región codificante de las CP de hongos, tienen un mayor grado de conservación. Del lado distal del grupo hemo se encuentra conservada la triada catalítica Arg87/Trp90/His91 (en la CP de *N. crassa*). De igual forma, el Asp121, involucrado en el control de acceso del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al sitio activo y el aducto covalente Trp90-Try238-Met264 están conservados. La triada de aminoácidos His229/Trp330/Asp389 del lado proximal del hemo también está conservada (Figura 6).

*N. crassa* AAL66352 753 aa 1 --MSECPVR----KSNVGGGGTRNHDWVPAQLRLNLRQHTPVSNPLDKD 44  
*C. globosum* XP\_001221369 749 aa 1 --MGECPVN---HANVAGGGTRNNDWVNPQLRLNLRQHQPASSPYSKE 44  
*M. gisea* EDJ99644 750 aa 1 --MGECLPR----TANVAGGGTRNRDWWPNTLKNLNRQHTTEATNPYDPN 44  
*A. fumigatus* EAL85001 759 aa 1 MTQDKCPFKEQSSQPNFAGGGTSNKDWWPDRLLKNLNRQHTAVSNPLDAD 50  
*P. marneffei* AAN04057 748 aa 1 MAESKCPAHQHVLANVGGAGTSNQDWWPDRLLKNLNRQNNPVSNNPLGEE 50  
*A. nidulans* XP 680657 739 aa 1 MGSNECPYSRQ--NANI GGGGQNRDWWPDDLKNLNRQHNVSNNPLDKG 48  
\* \*\*

*N. crassa* AAL66352 753 aa 45 FDYAAAFKSLDYEGLKKDLTKLMTDSQDWWPADFGHYGGIFIRMAWHSAG 94  
*C. globosum* XP\_001221369 749 aa 45 FDYAAAFKSLDYEALKKDITAVMTDSQDWWPADFGHYGGIFIRMAWHSAG 94  
*M. gisea* EDJ99644 750 aa 45 FDYAEAFKSLDYEGLKKDLRALMTDSQEYWPADFGHYGGIFVIRMAWHSAG 94  
*A. fumigatus* EAL85001 759 aa 51 FDYAAAFNSLDYEGLKKDLRALMTDSQDWWPADFGHYGGIFIRMAWHSAG 100  
*P. marneffei* AAN04057 748 aa 51 FDYAAAFNSLDYFALKKDIQDLMTDSQDWWPADFGHYGGIFIRMAWHSAG 100  
*A. nidulans* XP 680657 739 aa 49 FDYTAAFNSLDYFGLKRDLEALMTDSQDWWPADFGHYGGIFIRMAWHSAG 98

*N. crassa* AAL66352 753 aa 95 TYRVTDGRGGGEGQQRFPAPLNSWPDNVSLDKARRLLWPIKQKYGNKISW 144  
*C. globosum* XP\_001221369 749aa 95 TYRVFDGRGGSGQQRFPAPLNSWPDNVSLDKARRLLWPKQKYGDKISW 144  
*M. gisea* EDJ99644 750 aa 95 TYRVMDGRGGGQGGQQRFPAPLNSWPDNVSLDKARRLLWPIKQKYGNKISW 144  
*A. fumigatus* EAL85001 759 aa 101 TYRVFDGRGGGQGGQQRFPAPLNSWPDNVSLDKARRLLWPIKQKYGNKISW 150  
*P. marneffei* AAN04057 748 aa 101 TYRVADGRGGGQGGQQRFPAPLNSWPDNVSLDKARRLLWPIKQKYGNKISW 150  
*A. nidulans* XP 680657 739 aa 99 TYRVFDGRGGGQGGQQRFPAPLNSWPDNVSLDKARRLLWPIKQKYGSKISW 148

*N. crassa* AAL66352 753 aa 145 SDLLLLTGNALESMSGFKTFGFAGGRPDTWEADESVYWGAEITWLGNEDR 194  
*C. globosum* XP\_001221369 749 aa 145 ADLLLLTGNALESMSGFKTFGFAGGRPDTWEADESAYWGEKFTWLGNDVR 194  
*M. gisea* EDJ99644 750 aa 145 ADLMLLTGNALEDMGFKTFGFAGGRPDTWEADESTYWGGETTWLGNEVR 194  
*A. fumigatus* EAL85001 759 aa 151 ADLLILTGNALESMSGFKTFGFAGGRPDTWEADEATYWGRETWLGNDAR 200  
*P. marneffei* AAN04057 748 aa 151 ADLLLLTGNALESMSGFKTFGSGGRADTWEVDESANWGETTWLGNDVR 200  
*A. nidulans* XP 680657 739 aa 149 ADLLILAGNALESMSGFKTFGFAGGRSDTWEADQSVFWGGEKEWLGNDVR 198

*N. crassa* AAL66352 753 aa 195 YSEGQEGHGHGVVQGDSEKQHTDIHNRDLQSPPLASSHMGLIYVNPEGP 244  
*C. globosum* XP\_001221369 749 aa 195 YQGQNEGVAGQGVVDGSEKKGHRDHSRDLSEPLAAAHMGLIYVNPEGP 244  
*M. gisea* EDJ99644 750 aa 195 YSSGNEGHKESGVIDGSESKGKHDIHTRDLEKPVSAAHMGLIYVNPEGP 244  
*A. fumigatus* EAL85001 759 aa 201 YAKFGSGDKSRGLIAD--EESHKTTSHRELETPLAAAHMGLIYVNPEGP 248  
*P. marneffei* AAN04057 748 aa 201 YSGG-----KADHKDIHNRDLKPLAAAHMGLIYVNPEGP 235  
*A. nidulans* XP 680657 739 aa 199 YLNG-----ELDNPLAASHMGLIYVNPEGP 223  
\*

*N. crassa* AAL66352 753 aa 245 DGIPDPVAASAKDIRVTFGRMAMNDEETVALIAGGHSFGKTHGAGPHTHV 294  
*C. globosum* XP\_001221369 749 aa 245 DGIPDPVAAGRDIRTTFRMAMNDEETVALIAGGHTFGKTHGAPAVNV 294  
*M. gisea* EDJ99644 750 aa 245 DGIPDPVAAARDIRTTFRMAMNDEETVALIAGGHTVFGKTHGAPSDNV 294  
*A. fumigatus* EAL85001 759 aa 249 DGNPDPVAAAHDIRTFGRMAMNDEETVALIAGGHTFGKTHGAPADNV 298  
*P. marneffei* AAN04057 748 aa 236 DGNPDPVIAAKDIRTTFRMAMNDEETVALIAGGHTFGKTHGAGPADKL 285  
*A. nidulans* XP 680657 739 aa 224 NKNPDPVLAAKDIRITFRMAMNDEETVALIAGGHTFGKTHGAPATHL 273

*N. crassa* AAL66352 753 aa 295 KEPEAAPTEHQGLGWANSFGQGKGPDTTITSGLEVITWTKPTPTKWGMGYLEY 344  
*C. globosum* XP\_001221369 749 aa 295 KEPEAAPLEQQGLGWSNKHGTGKGPDTTITSGLEVIWTKPEPTWTHNF 344  
*M. gisea* EDJ99644 750 aa 295 PEPEAAPTEHQGLGWSNKHGSGKGPDTTITSGLEVIWTKPEAKPTMNYLEY 344  
*A. fumigatus* EAL85001 759 aa 299 KEPEAAGLEAQGLGWANKHGSKGPDTTITSGLEVITWTKPTPTQNNNF 348  
*P. marneffei* AAN04057 748 aa 286 PEPEADMAQQGLGWTNSFKSGKGPDTTITSGLEVITWTKPTKWSNQF 335  
*A. nidulans* XP 680657 739 aa 274 KEPHGAGLEHQGLGWESGFESGTRHAIITSGLEVIWTKPTPTKWSNQF 323  
\*

*N. crassa* AAL66352 753 aa 345 LYKFDWEPTKSPAGANQWAKNAEPTIPDAYDPNKKKLPMTLTTDLALRM 394  
*C. globosum* XP\_001221369 749 aa 345 LFKFEWELTKSPAGANQWAKNTEPIIPDAFDPNKKHLPRMLTTDLALRF 394  
*M. gisea* EDJ99644 750 aa 345 LFKYEWELTKSPAGANQWAKNAEPIIPDAFDPNKKHKPRMLTTDLALRF 394  
*A. fumigatus* EAL85001 759 aa 349 LFKFEWELTKSPAGAHQWAKNAEIPDAYDASKKHKPTMLTTDLALRF 398  
*P. marneffei* AAN04057 748 aa 336 LFRYDWELTKSPAGAHQWAKNAEAFIPDAFDPNKKRPMMLTTDLALRF 385  
*A. nidulans* XP 680657 739 aa 324 LFKYDWELTKSPAGAHQVAKGVPEPIIPDPDFPSIKHPPRMLTTDLALRF 373

*N. crassa* AAL66352 753 aa 395 DPAYDKICRDYLANPDKFADAFARAWFKLLHRDMGPRTRWIGPEVPSSEIL 444  
*C. globosum* XP\_001221369 749 aa 395 DPEYEKISRRFLENPDQFADAFARAWFKLLHRDLGPRSRWLGPPEIPSEVL 444  
*M. gisea* EDJ99644 750 aa 395 DPEYEKISRRFLENPEQFKDAFARAWFKLLHRDMGPRSRWLGPPEVPEK 444  
*A. fumigatus* EAL85001 759 aa 399 DPAYEKIARRFLBHPDQFADAFARAWFKLLHRDMGPRARYLGPPEVSEVL 448  
*P. marneffei* AAN04057 748 aa 386 DPIYEKISRRFLEHPDQFADAFARAWFKLLHRDLGPRALYIGPEVPAEVL 435  
*A. nidulans* XP 680657 739 aa 374 DPEYEKISRRFLENPDQFADAFARAWFKLLHRDVGPRVLYQGPPEVSEVL 423  
*N. crassa* AAL66352 753 aa 445 PWEDIYIPVVDYQIIDDNDIAALKKEILATGVAPKKLIFVAWSASSFRGS 494  
*C. globosum* XP\_001221369 749 aa 445 IWEDPVPVAVNHPLVDEQDVTTLKRAILATGVAPAKLISAWASASTFRGG 494  
*M. gisea* EDJ99644 750 aa 445 LWEDPIPTPDHPIDIGSDVDSLKKAAILATGVAPSKLIQTAWASASTFRGG 494  
*A. fumigatus* EAL85001 759 aa 449 IWQDPIPAVNHPLVDASDIAALKDEILASGVPPRSFISAWASASTFRGS 498  
*P. marneffei* AAN04057 748 aa 436 PWQDPPVAVDHPPLISNEDASALKQRILASGVKPSLISAWASASTFRGS 485  
*A. nidulans* XP 680657 739 aa 424 IWQDPPVPLDHPVIDNDIATLKKAILNSGISHTDLFSTAWASASTFRGS 473

<i>N. crassa</i> AAL66352 753 aa	495	DKRGGANGARIRLAPQNEWKVNDPSTLREVLAALESVQOKFNDSSSGKK-	543
<i>C. globosum</i> XP_001221369 749 aa	495	DKRGGANGARIRLAPQKDWKVNPPQLAEVLKALEGVQAQFNGASQSKK-	543
<i>M. gisea</i> EDJ99644 750 aa	495	DKRGGANGARIRLEPQNKWEVNNPQQLAEVLKALEGVKADFE--KSGKK-	541
<i>A. fumigatus</i> EAL85001 759 aa	499	DKRGGANGARIRLAPQRDWEVNNQPWLREALSALAEVQSRFN-ARGDSKK	547
<i>P. marneffeii</i> AAN04057 748 aa	486	DKRGGANGARIRLSPQREWAVNNQPWLRETLVLEAIQKQFNDSQSGGKK	535
<i>A. nidulans</i> XP 680657 739 aa	474	DKRGGANGARIRLSPQKNWKNVSQPWLSESLAALEKIQKQFNDAQSTDKR	523
<i>N. crassa</i> AAL66352 753 aa	544	VSLADLIVLGGVAALEQASG-----LVVPFTPGRNDAEQEHTDVHSFTHL	588
<i>C. globosum</i> XP_001221369 749 aa	544	VSLADLIVLGGVAALEQAAG-----VSPVFTPGRTDASQEQTEVESFAHL	588
<i>M. gisea</i> EDJ99644 750 aa	542	VSIADLIVLAGVAAVEQAAG-----VPVFTPGRGDASQEQTDVESFTHL	586
<i>A. fumigatus</i> EAL85001 759 aa	548	VSLADLIVLAGCAAVEKAAQDAGHPKVPFVPGRMDASQEEITDVQSFNLM	597
<i>P. marneffeii</i> AAN04057 748 aa	536	VSIADLIVLAGVAAVEKAAARDAGYAVTVPFTPGRTDASQEQTDVQSFSDM	585
<i>A. nidulans</i> XP 680657 739 aa	524	VSLADLIVLAGAASLEKAAARDAGHNVSVSFTPGRTDASQEQTDVDSFNLM	573
<i>N. crassa</i> AAL66352 753 aa	589	EPHADGFRSYGKGTKRVRTEQFLIDRASLLTLSAPELTALIGGLRVLN	638
<i>C. globosum</i> XP_001221369 749aa	589	EPHVDGFRSYGRGTSRVSTEQFLVDRAHLLTLPPELAVLVGGLRVLN	638
<i>M. gisea</i> EDJ99644 750 aa	587	EPAADAFRNYGKGTSRVTEQIMVDRAQQLTLTAPELTVLVGGLRVLN	636
<i>A. fumigatus</i> EAL85001 759 aa	598	EPFADGFRNFAKGPAPRAEHYLVDKAQLLNLSAPEMTVLVGGGLRVLN	647
<i>P. marneffeii</i> AAN04057 748 aa	586	EPHADGFRNYGSSTSRVRAEELIDKAQLLTLTAPELAVLIGGLRVLN	635
<i>A. nidulans</i> XP 680657 739 aa	574	EPHADGFRNYGRGTPRVLTEFLIDKAQLLNLSPPPELTVLIGGLRVLN	623
<i>N. crassa</i> AAL66352 753 aa	639	YDGSYGVLTKTTPGKLTNDYFVNLLDNTAWKAADNEGEVFIQYDRKTHD	688
<i>C. globosum</i> XP_001221369 749 aa	639	YDGSNGVFTTRPGKLTNDYFVNLLDMATAWKSVD--GEVFEQNDRKTGE	686
<i>M. gisea</i> EDJ99644 750 aa	637	YDGSYGVVWTDKTPGKLTNDFFVTLDDPYTSWKSVD--GEVFEQNTSKSG-	683
<i>A. fumigatus</i> EAL85001 759 aa	648	YDGSYGVFTSRPGALTNDFVHLLDMNTAWKDVGN-GELFEGSDRKTGG	696
<i>P. marneffeii</i> AAN04057 748 aa	636	YDGSYGVFTQTPGKLTNDFFVNLLDMNTAWKSIGG-VDLYEQTDRTGA	684
<i>A. nidulans</i> XP 680657 739 aa	624	YDRSNLGVFTKTPGQLTNDFVNLLDMGVQWKPADDTNEIFIGSDRKTGQ	673
<i>N. crassa</i> AAL66352 753 aa	689	KKWTATRADLIFGAHAELRALAEVYAAVDGEEKFKRDFVAAWHKVMNDR	738
<i>C. globosum</i> XP_001221369 749 aa	687	KKWTGTRADLVFGAHAELRAISEVYGSSSGQDKFVKDFVAAWKSVMNDR	736
<i>M. gisea</i> EDJ99644 750 aa	684	KKLTGTRADLVFGSHSELRALAEVYGSADGQKFTKDFVAAWKSVMNDR	733
<i>A. fumigatus</i> EAL85001 759 aa	697	KKWTATRADLVFGSNAELRAIAEVYASNDGDMKFKDFVAAWKSVMNDR	746
<i>P. marneffeii</i> AAN04057 748 aa	685	KKWTATRNDLVFGSNAELRAIAEVYGSSDGQEKFKDFVAAWKSVMNDR	734
<i>A. nidulans</i> XP 680657 739 aa	674	ARWKASRADLVFGSHAELRAISEVYGSSDGEAKFKDFVAAWKSVMNDR	723
<i>N. crassa</i> AAL66352 753 aa	739	FDLKQEGRGQNAPKL-- 753	
<i>C. globosum</i> XP_001221369 749 aa	737	YDLAQPGSSGPKL---- 749	
<i>M. gisea</i> EDJ99644 750 aa	734	FVRRGIYDETRLSKSL 750	
<i>A. fumigatus</i> EAL85001 759 aa	747	FDLKGGKQ-TIPARL--- 759	
<i>P. marneffeii</i> AAN04057 748 aa	735	FDLKQKQSTSSHRL--- 748	
<i>A. nidulans</i> XP 680657 739 aa	724	FDLKQGTGLAQRKPKL- 739	

**Figura 6. Alineamiento de la CAT-2 con algunas CP representativas de los hongos** Encerrados en un cuadro azul se muestran los aminoácidos del lado distal de la cavidad del hemo y en un cuadro rojo los aminoácidos del lado proximal. Los asteriscos indican los residuos conservados que forman parte del sitio de coordinación del hemo en las CP. En negritas se muestran algunos aminoácidos conservados e importantes para la actividad catalítica de las CP. El alineamiento se hizo utilizando el programa BioEdit.

Se conoce poco acerca de la función de las CP en los hongos. Cat2 de *A. fumigatus* es un posible factor de virulencia. Inoculando este hongo en la rata se encontró que Cat2 protegía de manera transitoria al hongo del estrés oxidante producido por el huésped (Paris *et al.*, 2003).

*cpeA* es el gen que codifica para la CP de *A. nidulans*. La transcripción de este gen se induce en condiciones de privación de carbono y durante el desarrollo sexual (Scherer *et al.*, 2002). La expresión específica de *cpeA* en las células Hülle depende del regulador StuA, el cual funciona como un activador de *cpeA*.

El gen *cpeA* codifica para una CP en el hongo patógeno *Penicillium marneffe*. El gen *cpeA* se expresa durante el desarrollo del hongo y su transcrito está presente en los conidios. La síntesis elevada del transcrito de *cpeA* en la fase de levadura, que es la forma patógena del hongo, permite la supervivencia del hongo dentro de su huésped (Pongpom *et al.*, 2005).

### **La CP de *N. crassa***

De las cuatro catalasas que tiene *N. crassa*, tres de ellas son monofuncionales y la cuarta es una CP, la cual está codificada por el gen *cat-2*, el cual se localiza en el cromosoma VII (Peraza, 2005), no tiene intrones y codifica para 753 aminoácidos.

La CAT-2 es una enzima citosólica. La acumulación del transcrito y de la actividad de la enzima se inducen cuando el hongo crece en una fuente pobre en carbono, como el metanol, el acetato o el urato. Asimismo se induce con el choque térmico, durante la fase tardía del crecimiento estacionario y en los conidios (Peraza, 2005). En todas estas condiciones hay degradación de proteínas por lo que se piensa que la enzima está asociada con los procesos de autofagia y autólisis del hongo.

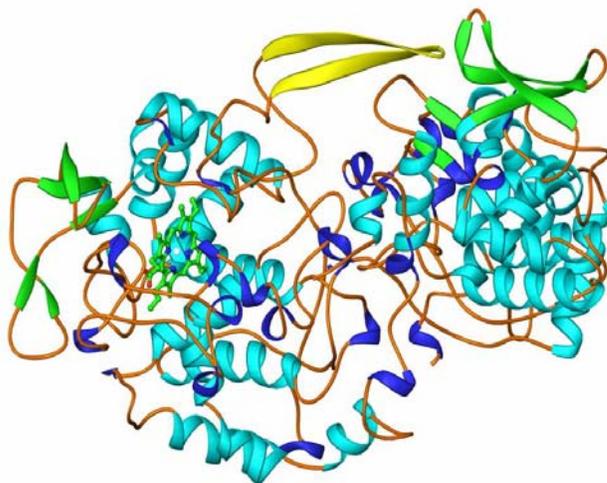
A diferencia de otras CP, la CAT-2 tiene una mayor eficiencia catalítica, un pH óptimo más ácido para la actividad de catalasa, una cinética de saturación de dos componentes y es activa a concentraciones molares de peróxido de hidrógeno (Peraza, 2005).

La enzima se ha purificado de *N. crassa*. El valor de Reinheitszahl o  $R_z$ , definido como la relación de absorbencia  $A_{\text{Soret}}/A_{280}$  de la CAT-2 que se obtuvo es relativamente bajo (0.46), lo que posiblemente indica que no toda la enzima tiene hemo, porque tal vez lo pierda con facilidad, o bien que tiene pocos aromáticos o que no están expuestos. La mayor parte del hemo está oxidado. Separada la enzima mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida, la mayor actividad se detecta en el homodímero, cuyo peso molecular es de aproximadamente 165 kDa, también se detecta actividad en la región correspondiente a un homotetramero y al monómero. El peso molecular de cada subunidad es de 83.4 kDa, más el grupo hemo.

La CAT-2 tiene actividad de catalasa y de peroxidasa. Puede reducir el  $H_2O_2$  y otros peróxidos orgánicos como el ter-butilhidroperóxido usando como agente reductor la o-dianisidina, el guayacol, la diaminobencidina, el ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) y el ascorbato.

La proteína tiene los aminoácidos que están conservados en todas las CP, mismos que son necesarios para la unión del hemo (His279, y Asp389) y para la actividad de la enzima (Arg87, Trp90, His91 y Asn121). La secuencia de aminoácidos de la CAT-2 es muy similar a la de las otras CP de hongos, con una identidad entre 65 y 77% (ver la Figura 5) (Peraza, 2005).

La CAT-2 presenta las dos asas que restringen el canal de acceso al sitio activo de las CP en la superficie del dominio N-terminal (Carpena *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2002). De éstas, la denominada asa LL1, se encuentra cubriendo la hendidura que se forma entre los dos dominios del monómero de la CAT-2. Un modelo de la estructura tridimensional de la CAT-2, construido con base en la similitud entre las proteínas homólogas para las cuales se conoce la estructura, reveló que la diferencia más notable entre la estructura de la CAT-2 con respecto a la de las otras CP es una extensión adicional en dicha asa (Figura 7). Esta extensión se encuentra en las CP de los hongos *Gibberella zeae* y en varios *Aspergilli* y también en algunas proteobacterias como *Xanthomonas*, *Pseudomonas* y *Xylella* (Peraza L y Hansberg W, datos no publicados).



**Figura 7. Modelo de la estructura tridimensional de la CAT-2**

Representación en listones de la estructura secundaria y terciaria del monómero de la CAT-2.

Verde, láminas  $\beta$ ; azul claro, hélices  $\alpha$ , azul oscuro, hélices<sub>3<sub>10</sub></sub>; y amarillo, la extensión del asa LL1. El grupo hemo se muestra representado en bastones y esferas (verde) (Peraza, 2005).

Al evaluar el proceso de conidiación en cultivos líquidos de una cepa con el gen *cat-2* anulado (*cat-2<sup>RIP</sup>*) se encontró que la ausencia de la enzima resultaba en una mayor formación de conidios durante la etapa tardía del crecimiento estacionario (4-5 días). La cantidad de conidios producidos fue del doble en la cepa sin *cat-2* que en la cepa silvestre o que en otras cepas mutantes en genes antioxidantes, como en una cepa sin el gen *cat-3* o sin el gen *sod-1*. Esta diferencia en el número de conidios formados entre la cepa silvestre y la *cat2<sup>RIP</sup>* se hace aún más evidente al utilizar como fuente de carbono el ácido oléico en presencia de baja concentración de sacarosa (Peraza, 2005).

Debido a que el proceso de conidiación de *N. crassa* en cultivos sumergidos se ha estudiado poco y no se conocen los elementos que lo regulan ni los que la diferencian de la conidiación aérea, decidimos estudiar en este trabajo si la CAT-2 es importante para la diferenciación celular del hongo y en particular para el proceso de conidiación sumergida. Además, puesto que la mayoría de estudios sobre el mecanismo catalítico de las CP se han realizado para las CP de bacterias y arqueobacterias nos interesa estudiar la estructura y el mecanismo catalítico de la CAT-2.

## OBJETIVOS

**Objetivo general:** Analizar la función de la catalasa-peroxidasa (CAT-2) de *N. crassa*

### Objetivos particulares

#### I. Evaluar el fenotipo de la cepa $\Delta cat-2$ :

- En la producción de conidios en condiciones de cultivo líquido con respecto a la cepa silvestre.
- En la producción de conidios aéreos.
- En la producción de carotenos
- En el crecimiento radial
- Determinar si hay oxidación de proteínas relacionadas con la producción de conidios en cultivos líquidos y si ésta es mayor en la cepa  $\Delta cat-2$  que en la cepa silvestre.

#### II. Generar mutantes monofuncionales de la CAT-2

- Sustituir el triptofano 90 (W90) del gen *cat-2* por una alanina para eliminar la actividad de catalasa de la enzima.
- Complementar la cepa *cat-2*<sup>RIP</sup> de *N. crassa* con el gen *cat-2W90A*.
- Analizar si con la mutación introducida en el gen *cat-2* se genera una CAT-2 monofuncional.
- Expresar la enzima mutada en el W90, expresarla en *E. coli* y determinar su actividad de catalasa y de peroxidasa.
- Sustituir la arginina 426 (R426) del gen *cat-2* de *N. crassa* y expresarla en *E. coli*.
- Purificar la enzima mutada en la R426 y determinar su actividad de catalasa y de peroxidasa.
- Analizar si con la mutación introducida en el gen *cat-2* se genera una CAT-2 monofuncional.

#### III. Purificar a homogeneidad a la CAT-2 de *N. crassa* expresada en *E. coli*.

**IV.** Determinar si la CAT-2 tiene una unión covalente entre el triptofano 90 (W90), la tirosina 238 (Y238) y la metionina 264 (M264), como el de las CP bacterianas.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### Cepas y plásmidos utilizados

- Cepas de *N. crassa*

La cepa silvestre 74-OR231A utilizada en este trabajo provino de la colección del centro de genética de hongos “Fungal Genetics Stock Center” (FGSC), del linaje ST. Lawrence (Oak Ridge, Cal. EUA).

Las cepas mutantes *cat-2<sup>RIP</sup>-7* y la cepa *cat-2<sup>RIP</sup>; his3<sup>-</sup>*, fueron generadas por el Dr. C. Leonardo Peraza Reyes. La cepa  $\Delta$ *cat-2* se generó en el laboratorio por David Zamorano. Las cepas TpCP5 y TpCP7 se generaron en este trabajo

- Plásmidos

Los plásmidos pCP5 y pCP7 fueron construidos por el Dr. C. Leonardo Peraza Reyes. El plásmido pCP5 tiene el gen *cat-2* silvestre. El plásmido pCP7 contiene el gen *cat-2* con la sustitución del triptófano 90 por alanina. Los plásmidos pQC2-3D y pW90A se generaron en este trabajo.

- Cepas de *E. coli*

Se usó la cepa JM109 para almacenar y mantener los plásmidos pQC2-3D y pW90A7-1, ya que produce suficiente represor *lac* para bloquear la transcripción del gen de interés, pero es menos eficiente para expresar la proteína.

La cepa de *E. coli* M15 [pREP4] de QIAGEN (No.Cat.34210.) tiene el fenotipo  $\text{Nal}^s$ ,  $\text{Str}^s$ ,  $\text{Rif}^s$ ,  $\text{Thi}^-$ ,  $\text{Lac}^-$ ,  $\text{Ara}^+$ ,  $\text{Gal}^+$ ,  $\text{Mtl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{RecA}^+$ ,  $\text{Uvr}^+$ ,  $\text{Lon}^+$  y contiene el plásmido pREP4, que confiere resistencia a la kanamicina. Esta cepa se empleó para expresar la CAT-2 y las mutantes respectivas.

#### Condiciones de crecimiento para *Neurospora crassa*

Para el crecimiento de *N. crassa* se utilizó el medio mínimo Vogel-sacarosa (VS), el cual contiene: 1.5% de sacarosa como fuente de carbono y sales de Vogel (Davis and De Serres, 1970)

Los medios de cultivo sólidos se hicieron con agar al 2%. El crecimiento en cultivos líquidos se realizó a partir de  $10^6$  conidios/ml con una relación aire/líquido 4:1 y se agitó de manera orbital a 200 rpm.

Para la obtención de colonias aisladas de *N. crassa* se sembraron conidios o se estrió a partir de una colonia aislada en medio de cultivo con sorbosa, el cual contiene: sales de Vogel 1x, 2% de L-sorbosa, 0.05% de fructosa, 0.05% de Glucosa y 2% de agar (Difco) (Davis y De Serres, 1970).

Para el crecimiento en condiciones restringidas de carbono se utilizó glucosa 0.2% y ácido oléico 0.5%. Se agregó Tween 80, 0.2% como emulsionante.

Para crecer al hongo en medio sólido en presencia de metanol, se inocularon matraces medio mínimo de Vogel con 0.6% de sacarosa, 2% de agar y 4% de metanol. Los cultivos se incubaron durante cinco días en oscuridad y tres días con iluminación.

En todos los casos, la temperatura de incubación empleada para el crecimiento de *N. crassa* fue de 30°C.

#### **Obtención de conidios de *N. crassa***

Para la obtención de conidios se inocularon matraces de 500 ml con 100 ml de medio sólido VS-agar 2% con  $1 \times 10^6$  conidios. Los cultivos se incubaron a 25°C, tres días en la oscuridad a 30°C y dos días con luz. Después de este periodo se recuperaron los conidios agregando 50 ml de agua estéril fría y agitando en frío. La suspensión de conidios se colectó en tubos Eppendorff de 1.5 ml y se almacenaron a -70°C.

#### **Cálculo del porcentaje de agregación en las cepas de *Neurospora crassa***

Se contó el número de cultivos agregados y el de cultivos no agregados para cada cepa y se calculó el porcentaje de agregación tomando como 100% el número total de cultivos. Los cultivos agregados son aquellos en los que las hifas formaron una sola masa micelial. Los cultivos no agregados son aquellos en los que las hifas se mantuvieron disgregadas.

#### **Extracción del ADN genómico de *N. crassa***

Se inocularon  $1 \times 10^6$  conidios/ml en 10 ml de medio mínimo Vogel líquido con 1.5% de sacarosa, en matraces de 50 ml. El cultivo se incubó a 30°C durante 48 horas sin agitación. Una vez transcurrido este tiempo, con una espátula se recuperó la película

de micelio que creció en la superficie, se secó con papel absorbente y se congeló en nitrógeno líquido. Posteriormente, el micelio se secó al vacío utilizando una centrífuga Speed Vac SC110 (Savant) durante 4 horas y se pulverizó con una espátula. El método empleado para la purificación del ADN fue el de Timberlake (1980).

### **Integración dirigida de *cat-2* y *cat-2W90A* en el locus de *his3*.**

La sustitución del triptofano 90 por una alanina en la secuencia del gen *cat2* se realizó empleando el estuche Quick change II (STRATAGENE) siguiendo las instrucciones del proveedor (ver los detalles adelante en “Mutagénesis sito-dirigida del gen *cat-2*”).

Para introducir una copia del gen *cat-2* mutado (*cat-2W90A*) en el genoma de *N. crassa* se utilizó el vector pCP7 que contiene el gen *cat-2W90A* adyacente a un fragmento del gen *his-3*, que complementa la cepa *his-3* con el alelo Y234m723. Con este plásmido se transformó la cepa *cat2<sup>RIP</sup>;his-3<sup>-</sup>* y se recuperaron las cepas protótrofas de histidina. Después de realizar 4 ciclos de siembras a partir de una colonia aislada en medio de cultivo con sorbosa se obtuvieron las cepas transformantes en estado homocariote.

Para identificar las cepas en las que se integró el gen *cat-2W90A* junto al locus de histidina se realizó una hibridación tipo “Southern”. Para ello se analizó el ADN genómico de las transformantes digerido con la enzima *Eco* RI y se hibridó con las sondas de los genes *cat-2* y *trpC*.

La sonda *trpC* corresponde al gen *trpC*, que se obtuvo al digerir el plásmido pCP7 con las enzimas de restricción *Eco*RI *Xba*I y recuperar el fragmento de 710 pb.

La sonda *cat-2* corresponde al fragmento de 777 pb del gen *cat-2*, que se obtuvo al digerir el plásmido pQC2-3D con la endonucleasa de restricción *Bgl*II.

Se utilizó la misma estrategia de integración dirigida al locus de *his-3* para complementar la cepa *cat-2<sup>RIP</sup>;his3<sup>-</sup>* con el gen *cat-2* silvestre. Para complementar la cepa con el gen silvestre se usó el plásmido pCP5.

### **Análisis mediante hibridación tipo "Southern"**

La hibridación tipo "Southern" se realizó siguiendo el protocolo establecido (Sambrook and Russell, 2001). Los fragmentos generados a partir de 10-15 µg de ADN total digerido con la endonucleasa de restricción *EcoRI* se separaron por electroforesis en gel de agarosa (1%). El ADN fue desnaturalizado con NaOH (0.5M). Posteriormente, el ADN se transfirió por capilaridad a una membrana Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech #RPN303N, Buckinghamshire, UK) y después se fijó a la membrana de manera covalente con luz ultravioleta. En un equipo Stratalinker 2400 con una exposición de 120000 µjoules con 25 y 50 seg (STRATAGENE).

La sonda se marcó con 0.05 mCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP utilizando el estuche "Rediprime II Random Prime Labelling System" (# TRK432 Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron dos hibridaciones, una empleando la sonda *trpC* y otra con la sonda *cat-2*.

La membrana marcada se expuso a una película BioMat, sensible a los rayos X (Kodak), se guardó a -75°C y se reveló después de una semana de exposición.

### **Extracción del ARNm de *N.crassa***

Se inocularon 10 ml de medio mínimo líquido de Vogel con 1.5% de sacarosa, en matraces de 50 ml con  $1 \times 10^6$  conidios/ml. El cultivo se incubó a 30° C durante 48 horas sin agitación. Una vez transcurrido este periodo, se recuperó la película de micelio que creció en la superficie y se congeló en nitrógeno líquido. El micelio congelado se pulverizó con nitrógeno líquido. Posteriormente, se utilizó el reactivo TRIZOL (Invitrogen) para la purificación del ARNm siguiendo las instrucciones del proveedor.

### **Análisis mediante hibridación tipo "Northern"**

La hibridación tipo "Northern" se realizó siguiendo el protocolo establecido por Sambrook y Russell, 2001. Se cargaron 10 µg de ARN total por carril en un gel de agarosa al 1% con formaldehído. El ARN se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon (*Hybond-N*, Amersham Pharmacia Biotech #RPN303N) y se fijó con luz ultravioleta. Para la hibridación se empleó como sonda el fragmento *BgIII* del

plásmido pCP7 (777pb) indicado en la Figura 14, y que corresponde al gen *cat-2*.

#### **Extracción de proteína total de *N. crassa***

Para la extracción de proteína total se pulverizó el micelio con nitrógeno líquido en un mortero y el polvillo se resuspendió inmediatamente en amortiguador de extracción para proteína (HEPES 26.85 mM, Desferal, Fluoruro de fenilmetilsufonilo (PMSF por sus siglas en inglés) 1 mM y DTT 1 mM).

#### **Secuenciación del ORF del gen *cat-2W90A* integrado en el locus *his3***

Para asegurarnos de que la secuencia integrada del gen *cat-2W90A* estuviese libre de cualquier otra mutación que no fuera la mutación inducida por la mutagénesis, amplificamos mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) un fragmento de 5883 pb del plásmido integrado en el locus *his3*, que abarca un fragmento del gen de ampicilina, el gen *cat-2* y un fragmento del terminador de *trpC*. El ADN genómico extraído de la cepa TpCP7-17H se utilizó como molde para la reacción de amplificación y se secuenció la región correspondiente al ORF de *cat-2W90A*.

#### **Condiciones de crecimiento y almacenamiento de *Escherichia coli***

Para el crecimiento de *E. coli* se usó LB (GibcoBRL) al 2%. Los medios de cultivo sólidos se prepararon con agar al 2%. Los cultivos se incubaron a 37°C. En el caso de los cultivos líquidos se agitó a 280 rpm. En los casos requeridos se suplementó con los antibióticos ampicilina (100 µg/ml) y/o kanamicina (25 µg/ml).

Para la transformación de las células competentes se utilizó el medio SOB, el cual contiene 0.5% de extracto de levadura (BIOXON), 2% de peptona de caseína (BIOXON), NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y MgSO<sub>4</sub> 10 mM.

Las cepas de *E. coli* que contienen los plásmidos construidos en este trabajo se almacenaron a -70°C con glicerol al 15%.

#### **Construcción del plásmido pW90A7-1**

Para la construcción del vector de expresión pW90A7-1 se amplificó el gen *cat-2W90A* desde 3 pb río abajo del codón de inicio hasta el codón de término. El ADN

del plásmido pCP-7 (ver el anexo) se utilizó como molde. Se utilizó la enzima Elongase-mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) y el cebador cat2-5O, que contiene un sitio de corte para la enzima *SacI* (5' GACCGAGCTCTCCGAGTGC 3'), y el cat2-3O, que contiene un sitio de corte para la enzima *PstI* (5' GATCCTGCAGCTAAAGCTTGG 3'). El programa que se utilizó para la amplificación consistió en: una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, 1 ciclo, seguido por 30 ciclos de amplificación, cada uno compuesto por desnaturalización a 94°C (30 segundos), alineado a 54°C (45 segundos), extensión a 68°C (3 minutos) y extensión final a 68°C (10 minutos). La reacción de amplificación se realizó en presencia de 2 mM de MgCl<sub>2</sub>.

El producto de la amplificación se insertó entre los sitios *PstI* y *SacI* del vector de expresión pQE30 (ver el anexo). El vector pQE30 lleva el promotor inducible de la polimerasa del ARN del fago T5 y un sitio de unión al ribosoma, lo cual asegura una buena transcripción y traducción del gen insertado y del gen  $\beta$ -lactamasa (*bla*), que confiere resistencia a la ampicilina. El vector resultante se usó para transformar la cepa JM109 de *E. coli*. Para verificar la incorporación del plásmido en las cepas transformadas que mostraron resistencia a la ampicilina, se extrajo el plásmido de cada cepa y se realizó una digestión con la enzima *NcoI* para la cual hay dos sitios de corte, uno dentro del vector y otro dentro del inserto.

La secuenciación del gen clonado mostró que se había introducido con la reacción de amplificación una mutación en el aminoácido 385. Para corregir la mutación el plásmido pW90A-7 se digirió con la enzima *BglII* para eliminar un fragmento de 777 pb que contenía la mutación. El fragmento mutado se reemplazó por otro sin la mutación. El fragmento de 777pb sin la mutación se obtuvo al digerir el plásmido pCP7 (ver el anexo) con la enzima *BglII*. Los fragmentos se ligaron utilizando la ADN Ligasa (New England Biolabs). El plásmido resultante se nombró pW90A-7-1 (ver apéndice1). Este nuevo plásmido se secuenció para verificar la corrección de la mutación.

El ADN se recuperó de los fragmentos cortados del gel agarosa utilizando el estuche QIAquick Gel Extraction (No. Cat. 28704 QIAGEN GmbH, Alemania) de acuerdo con el procedimiento indicado por el fabricante. La extracción de plásmidos

se llevó a cabo usando el estuche Plasmid Mini Kit y QIAPREP (QIAGEN), siguiendo las especificaciones del fabricante. Los plásmidos se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Expresión de las mutantes de CAT-2 en *E. coli***

Los plásmidos usados para expresar las mutantes de CAT2W90A y CAT2R426A nos permitieron fusionar una etiqueta de seis histidinas al extremo N-terminal de las proteínas eliminando el codón de inicio. Para la expresión se utilizó el método descrito a continuación, con la diferencia de que los plásmidos empleados para transformar *E. coli* fueron los siguientes: pW90A-7-1y pR426A (ver anexo).

Se transformó la cepa de *E. coli* M15/pREP4 con el plásmido correspondiente. Después se hicieron crecer las células en un cultivo de 50 ml de medio LB líquido suplementado con ampicilina y kanamicina durante una noche a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente se resembró el cultivo de 50 ml en 1 L de medio LB líquido suplementado con antibióticos. El cultivo se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación de 300 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) de 0.5 (aproximadamente 2-3 horas). Luego se adicionó 1 mM del inductor IPTG (Gibco, BRL) y 3  $\mu\text{M}$  hemina y se continuó la incubación a lo largo de 4 horas. Después, se centrifugó el cultivo a 5000 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y la pastilla de células se resuspendió en 20 ml de amortiguador de lisis ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8.0). Posteriormente se rompieron las células con 1 mg/ml de lisozima (SIGMA) incubándolas en hielo durante 30 minutos, seguidos de tres ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a  $42^{\circ}\text{C}$ . Una vez rotas, las células se centrifugaron a 13,000 rpm durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se aisló el sobrenadante, que corresponde al extracto soluble, y se guardó a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

El extracto se sometió a una cromatografía de afinidad al níquel. Se realizaron dos lavados con amortiguador de lavado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH 8.0) y se desprendió la enzima con amortiguador de elución ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 8.0). Después de la elución, la enzima se concentró mediante centrifugación en un cono Amicon de 30000, con amortiguador de fosfatos 5 mM, pH 7.8.

La enzima purificada se separó mediante electroforesis en geles de

poliacrilamida (PAGE) en condiciones no desnaturizantes que se reveló en el gel su actividad de catalasa y de peroxidasa.

### **Purificación de la CAT-2 recombinante**

Para la expresión heteróloga de la CAT-2 se empleó la cepa de *E. coli* M150/pREP4. La cepa se transformó con el plásmido pQC2-3D. El plásmido usado para expresar la CAT-2 nos permitió fusionar una etiqueta de seis histidinas a la proteína en su extremo N-terminal. Para poder incluir esta etiqueta a la enzima, se quitó el ATG inicial de la proteína. Para la purificación de la CAT-2, primero se obtuvo extractos de proteína total a partir de cultivos de *E. coli* inducidos con 1 mM de IPTG durante 5-6 horas. Las células se rompieron con lisozima (1mg/ml) y 3 ciclos de congelación (con nitrógeno líquido) y descongelación (42°C). Para disminuir la viscosidad del extracto celular, se agregó ARNasa (10 µg/ml) y ADNasa (5 µg/ml) y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, el extracto de proteína se separó y se precipitó con dos volúmenes de acetona. El precipitado se resuspendió en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.8. La fracción soluble se pasó a través de una columna de Sephadex G75, previamente equilibrada con amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.8. Se colectaron fracciones de 1 ml a las cuales se les determinó su absorbencia a 403 nm en el espectrofotómetro. Se seleccionó las que tuvieron una absorbencia mayor a 0.05. Posteriormente, las muestras se purificaron mediante cromatografía de afinidad al níquel. La enzima purificada se lavó y concentró por centrifugación en un cono de membrana Amicon de masa de exclusión de 30000 con amortiguador de fosfatos 5 mM, pH 7.8. Para la inhibición de proteasas a lo largo del proceso de purificación se empleó una mezcla de inhibidores de proteasas (No. Cat. P8465, SIGMA) y PMSF 1 mM.

### **Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Los extractos de proteína obtenidos se analizaron en geles de poliacrilamida al 10% de 0.75 mm de grosor, en condiciones desnaturizantes, siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970). La desnaturización de las muestras se realizó por ebullición y empleando dodecil sulfato de sodio (SDS). Las muestras se

resuspendieron en 10 µl de amortiguador de carga 2x (20% glicerol, 0.125 M Tris/HCl pH 6.8, 4% SDS, 0.02% azul de bromofenol, 10% mercaptoetanol). Para realizar la electroforesis se empleó una cámara Mini-protean II (BIO-RAD). La electroforesis se realizó con el amortiguador de corrida (14.4% glicina, 0.3% Trizma base, 0.1% SDS) durante 50 minutos a 150 V. Al finalizar la corrida, el gel se tiñó con una solución de azul de Coomassie (240 mg de azul de Coomassie, 120 ml metanol, 40 ml de ácido acético, agua cbp 500 ml).

Para analizar las proteínas en su estado nativo, las muestras se analizaron mediante PAGE con poliacrilamida al 8% en condiciones no desnaturalizantes y se reveló en el gel la actividad de catalasa y de peroxidasa.

A las muestras se les agregó 10 µl de amortiguador de carga 2 x (10% glicerol, 5% Tris/HCl, pH 6.8; 0.02% azul de bromofenol). La electroforesis se realizó en amortiguador de corrida (glicina 1.44%, Trizma base 0.3%) durante 2 horas a 150 V.

El revelado de la actividad de catalasa en el gel se realizó de la siguiente manera: el gel se incubó en una solución de metanol al 5% durante dos minutos y se enjuagó dos veces con agua. Posteriormente se incubó durante 5 minutos en una solución de peróxido de hidrógeno 10 mM. Se enjuagó una vez más con agua y se agregó una mezcla 1:1 de ferrocianuro de potasio al 2% y cloruro férrico al 2%. El gel se dejó sumergido en esta solución hasta que se detectaron las zonas de actividad. Finalmente la reacción se detuvo con ácido acético al 10% (Lledias *et al.*, 1998).

Para revelar la actividad de peroxidasa en el gel se empleó una solución que contiene amortiguador de acetato de sodio 50 mM, pH 6.5; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM y o-dianisidina 0.1 mM como agente reductor (Obinger *et al.*, 1997). El gel se incubó en 30 ml de la solución hasta que se detectaron las zonas de actividad y se enjuagó con agua.

### **Cuantificación de la proteína total en los extractos celulares**

Para la cuantificación de la proteína total en los extractos celulares se utilizó el reactivo Bradford (BIO-RAD, No. Cat 500-0006), de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Se midió la absorbencia a 595 nm en un espectrofotómetro Beckman (DU 650). La medición se llevó a cabo inmediatamente después de agregar el reactivo de

Bradford.

En otras ocasiones, que se indican, se empleó el método de BCA para la cuantificación de la proteína (Thermo, Cat. 232228) siguiendo las especificaciones del proveedor. Se midió la absorbencia a 562 nm en un espectrofotómetro Beckman (DU650).

### **Acumulación de los carotenos en cultivos líquidos de *N. crassa***

Para cuantificar la acumulación de los carotenos en la cepa silvestre y en la mutante nula en *cat-2* se siguió el método reportado por (Yoshida and Hasunuma, 2004). Se partió de cultivos líquidos crecidos durante 48 horas en condiciones restringidas de carbono. Para el experimento se realizaron cultivos en diferentes condiciones de aireación.

Los carotenos se extrajeron de 50 mg de micelio liofilizado a los que se les agregó 3 ml de metanol. Se incubó 30 min a 60°C, se centrifugó y se hizo una re-extracción con 3 ml de acetona a 50°C por 30 min. Los extractos se mezclaron y se cuantificó la acumulación por su absorbencia a 470 nm.

### **Contenido de carbonilos en la proteína total de *N. crassa***

El micelio crecido en medio líquido se cosechó por filtración, se secó con acetona y se liofilizó. El contenido de carbonilos se determinó conforme al método reportado por (Ahn *et al.*, 1987). Brevemente, se extrajo la proteína y se eliminaron los lípidos (carotenos) empleando extracciones con butanol/cloroformo. Este paso se repitió al menos seis veces. Posteriormente se llevo la reacción del extracto de proteína con 2,4-dinitrofenilhidrazina en presencia de HCl 2 N. Las muestras control sólo se trataron con HCl. Se detectó la formación de fenilhidrazona por la diferencia entre la absorbencia de luz a 375 nm de las muestras tratadas con 2,4-dinitrofenilhidrazina y las muestras control.

Los resultados se expresaron como micromoles de dinitrofenilhidrazina incorporada por miligramo de proteína basado en un coeficiente de absorción promedio de  $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **Mutagénesis sito-dirigida del gen *cat-2***

Para introducir la mutación puntual en el W90 o en la R426 en el gen *cat-2* se utilizó el estuche Quick change II (STRATAGENE) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se hizo una amplificación utilizando como molde el ADN del plásmido pCP5 o pQC2-3D (ver el anexo). El producto amplificado se digirió con la enzima *DpnI* y se usó para transformar la cepa XLI-Blue de *E. coli*. Se seleccionó las colonias resistentes a la ampicilina. Finalmente los plásmidos candidatos se secuenciaron para identificar la presencia de la mutación deseada.

Los cebadores utilizados en la PCR para sustituir el triptofano por una alanina fueron: *cat2W90A5'* 5'CTCTTCATCCGCATGGCAGCGCACAGCGCCG3' y *cat2W90A3'* 5'CGGCGCTGTGCGCTGCCATGCGGATGAAGAG3'.

Los cebadores utilizados en la PCR para sustituir la arginina por una alanina fueron: *cat2-5fR426Ac* 5'CAAGCTTCTTCATGCCGACATGGGACCGCG3' y *cat2-3r426Ac* 5'CGCGGTCCCATGTGCGCATGAAGAAGCTTG3'.

# RESULTADOS

## I. Caracterización fenotípica de la cepa carente de *cat-2*

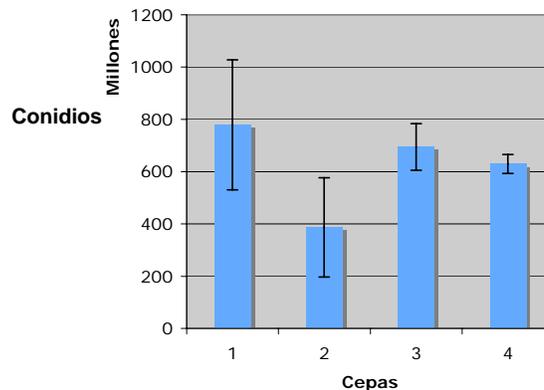
### I.1. La conidiación sumergida en las cepas sin *cat-2*

El proceso de conidiación en cultivos sumergidos de *N. crassa* se induce en condiciones de privación de carbono o de nitrógeno (Muller, 1989). Sin embargo, el proceso de conidiación sumergida se ha estudiado poco y no se conoce su regulación. En el laboratorio se observó que la cepa carente de la CAT-2 (*cat-2<sup>RIP</sup>*) formaba el doble de conidios durante la etapa tardía del crecimiento estacionario (4-5 días) que la cepa silvestre o que otras cepas mutantes en genes antioxidantes, como cepas sin el gen *cat-3* o sin el gen *sod-1*.

Para generar la cepa *cat-2<sup>RIP</sup>* 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 de ADN que se encuentran duplicadas. Así, cuando se introdujo una copia extra de *cat-2* y se cruzó esta cepa con una silvestre se produjeron cepas en las cuales se habían mutado ambas copias de *cat-2*. Es posible que durante el proceso de RIP se hayan introducido mutaciones en un gen contiguo a *cat-2*. Por lo anterior se requería corroborar que el fenotipo de conidiación sumergida se debía a la carencia del gen *cat-2* y no a mutaciones introducidas en algún gen contiguo. Actualmente contamos con otra cepa mutante de *cat-2* generada por la interrupción del gen con un cassette de higromicina con la que podemos corroborar el fenotipo de conidiación sumergida.

Para conocer si las cepas *cat-2<sup>RIP</sup>* y  $\Delta$ *cat-2* tienen el fenotipo de conidiación sumergida se analizó la formación de conidios en medio líquido durante la etapa del crecimiento estacionario tardío. Como controles usamos la cepa silvestre y una mutante nula en *cat-2* complementada con el gen (cepa TpCP5-4H). Peraza (2005) reportó que la diferencia en el número de conidios que forma la cepa *cat-2<sup>RIP</sup>* con respecto a la cepa silvestre es más evidente cuando se utiliza como fuente de carbono el ácido oléico en presencia de bajas concentraciones de sacarosa. Tomando en cuenta lo anterior, decidimos crecer el hongo en estas condiciones con

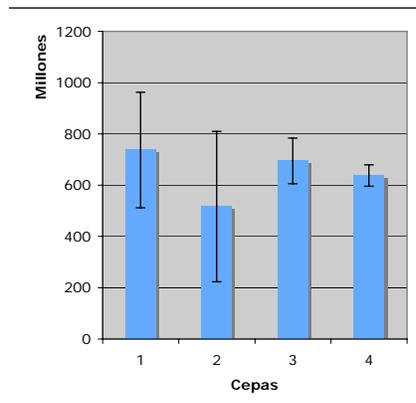
la diferencia de que se utilizó glucosa, en lugar de sacarosa en el medio de crecimiento. El número de conidios formados en las cepas carentes del gen *cat-2* y en la cepa silvestre se muestran en la Figura 8. Se muestra también el número de conidios producidos por de la cepa *cat-2<sup>RIP</sup>* complementada con el gen *cat-2* (TpCP5-4H).



**Figura 8 La formación de conidios en medio líquido de las cepas *cat-2<sup>RIP</sup>* y  $\Delta cat-2$ .** Las cepas  $\Delta cat-2$  (1), silvestre (2), *cat-2<sup>RIP</sup>* (3) y TpCP5-4H (4) se hicieron crecer en medio MV/glucosa-oleato y se cuantificó el número de conidios libres formados en la etapa estacionaria del crecimiento. Cada valor corresponde al promedio de tres experimentos independientes y la línea vertical sobre la barra a la desviación estándar.

Observamos que durante los experimentos en algunos cultivos las hifas se agregaban formando una sola masa micelial, mientras que en otros permanecían sin agregarse, a pesar de que las condiciones de crecimiento eran las mismas. Además, se observó que cuando las hifas se agregaban se producían más conidios que sin agregación. El porcentaje de cultivos en los que las hifas se agregaron para las cepas *cat-2<sup>RIP</sup>* y  $\Delta cat-2$  fue de 90.9% y 85.3%, respectivamente. Mientras que en la cepa silvestre fue sólo de 47.5%. La cepa complementada se comportó de manera semejante a las cepas mutantes, i.e. 90.6% de cultivos agregados.

El número de conidios formados en las cepas carentes del gen *cat-2* y la cepa silvestre, en cultivos con micelio agregado se muestran en la Figura 9.



**Figura 9** La formación de conidios en medio líquido de las cepas *cat-2<sup>RIP</sup>* y  $\Delta$ *cat-2* en los cultivos agregados. Las cepas  $\Delta$ *cat-2* (1), silvestre (2), *cat-2<sup>RIP</sup>*(3) y TpCP5-4H (4); crecieron en medio MV/glucosa-oleato y se cuantificó el número de conidios libres formados en la etapa estacionaria del crecimiento. Los resultados mostrados son el promedio de tres experimentos independientes y la línea vertical sobre la barra a la desviación estándar.

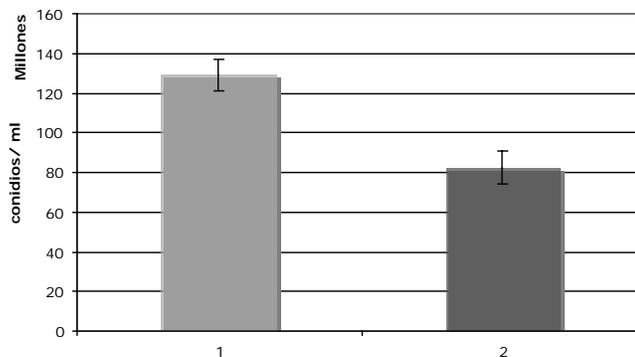
Estos resultados muestran que en las cepas mutantes nulas en el gen *cat-2* forman más conidios que la cepa silvestre en condiciones de cultivo líquidas porque se agregan más, pero en cultivos agregados la cantidad de conidios es la misma. La agregación de las hifas es el primer estado diferenciado a partir del cual se forman las siguientes estructuras diferenciadas.

Dado que consideramos más confiable trabajar con la cepa  $\Delta$ *cat-2* y a que el objetivo de este trabajo es caracteriza a la misma, la cepa *cat-2<sup>RIP</sup>* ya no se consideró para el resto de los experimentos.

Como sabemos que la actividad de la CAT-2 se encuentra en los conidios aéreos, decidimos analizar qué ocurre con la formación de éstos en la mutante  $\Delta$ *cat-2*.

## **I.2. La cepa $\Delta$ *cat-2* produce más conidios aéreos que la cepa silvestre**

Para examinar la producción de conidios en la cepa  $\Delta$ *cat-2* se colectaron los conidios formados después de que el hongo creció en medio sólido. El número de conidios formados en la cepa mutante fue mayor comparado con el de la cepa silvestre (Figura 10).



**Figura 10 La producción de conidios es mayor en la cepa  $\Delta cat-2$  que en la cepa silvestre.** Las cepas  $\Delta cat-2$  (1), silvestre (2); crecieron en medio MV/sacarosa y se cuantificó el número de conidios libres formados. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  error estándar.  $n= 3$ .  $\alpha= 0.05$  como nivel de significancia. ( $P < 0.006$ )

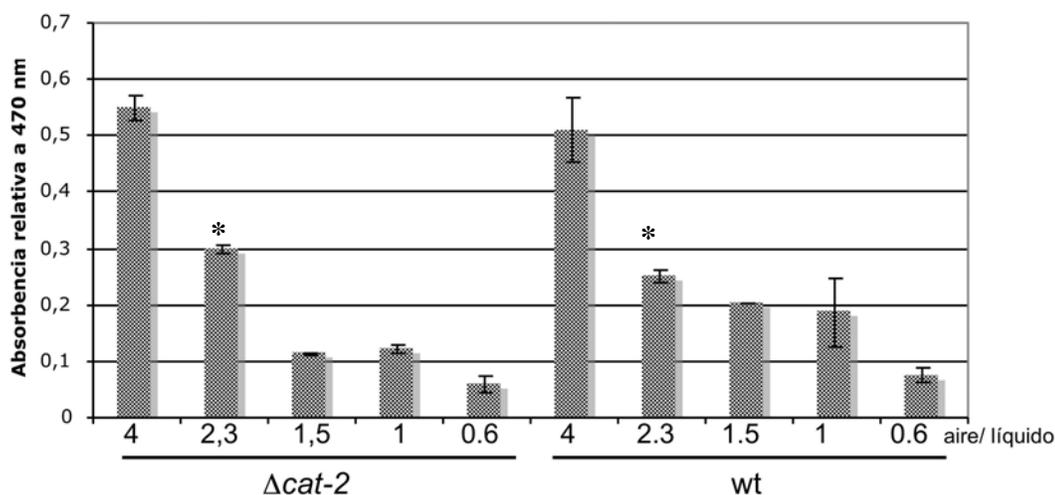
Los resultados indican que la ausencia de la CAT-2 es importante para la conidiación aérea.

### **I.3. La acumulación de los carotenos en condiciones de crecimiento restringidas de carbono.**

Durante la conidiación se induce la síntesis de los carotenos, éstos son compuestos antioxidantes cuya función es desactivar el oxígeno singulete. Los carotenos se acumulan particularmente en los conidios. Por ello, una manera de cuantificar la conidiación es midiendo la acumulación de carotenos.

Para analizar la acumulación de los carotenos como respuesta a la ausencia de la CAT-2 durante la etapa del crecimiento estacionario tardío en medio líquido, extrajimos los carotenos de la cepa silvestre y de la mutante nula  $\Delta cat-2$ . Se utilizó como fuente de carbono el ácido oléico en presencia de bajas concentraciones de glucosa (0.2%) en luz continua. Asimismo se probaron diferentes condiciones de aireación. Se extrajo los carotenos y se cuantificó su acumulación por la absorbencia a 470 nm (Yoshida and Hasunuma, 2004). Como se muestra en la Figura 11, las diferencias entre la cantidad de carotenos acumulados en las cepas  $\Delta cat-2$  y la cepa silvestre no son significativas a excepción de una de las condiciones probadas. En

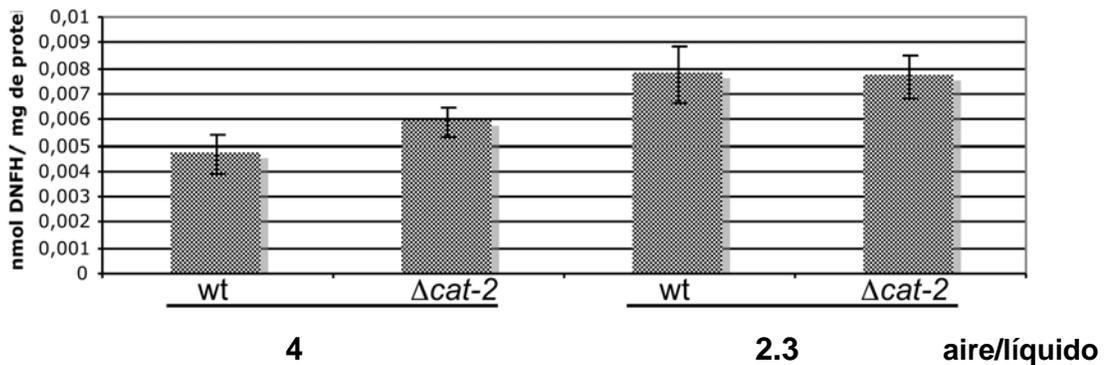
ambas cepas la acumulación de carotenos aumenta conforme a la aireación, indicando una respuesta a la tensión oxidante.



**Figura 11 La acumulación de carotenos en el micelio de la cepa silvestre y de la mutante  $\Delta cat-2$ .** Las cepas se hicieron crecer en medio MV/glucosa-oleato durante 48 h. La acumulación de carotenos se cuantificó por la absorbencia a 470 nm/ g de micelio en peso seco. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  error estándar. n= 3.  $\alpha= 0.05$  como nivel de significancia. \*P< 0.05

#### 1.4. Medición del contenido de carbonilos en la proteína total

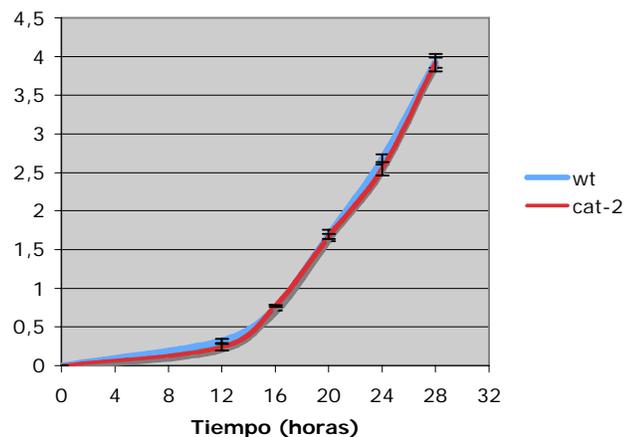
El aumento en el contenido de carbonilos en la proteína total refleja un aumento en el nivel de especies del oxígeno reactivas. Para saber si la ausencia de CAT-2 afecta el nivel de especies del oxígeno reactivas analizamos el contenido de carbonilos en la cepa silvestre y en la cepa  $\Delta cat-2$  conforme al método reportado por Ahn *et al.*, 1987. Los resultados encontrados se expresaron como micromoles de dinitrofenilhidrazina incorporada por miligramo de proteína, basado en un coeficiente de absorción promedio de  $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Los datos obtenidos muestran que las diferencias del contenido de carbonilos en la cepa  $\Delta cat-2$  y en la cepa silvestre (Figura 12) no son significativas.



**Figura 12** El contenido de carbonilos en el micelio crecido en diferentes condiciones de aireación es similar en la cepa silvestre (wt) y en la cepa  $\Delta cat-2$ . Cuantificación de proteínas carboniladas en la cepa wt o en la  $\Delta cat-2$ . Micelio creciendo en medio líquido a una relación de aire a líquido de 4 o, de 2.3. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  error estándar.  $n= 3$ .  $\alpha= 0.05$  como nivel de significancia. ( $P> 0.05$ )

### I.5. El crecimiento de la cepa $\Delta cat-2$

Al evaluar el crecimiento radial de la cepa  $\Delta cat-2$  en medio MV sólido usando sacarosa como fuente de carbono se encontró que ambas cepas crecen con la misma velocidad (Figura 13).



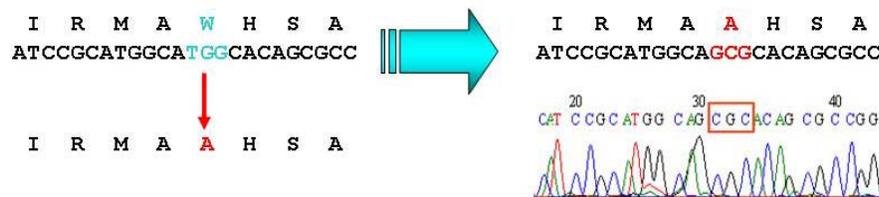
**Figura 13** La mutante  $\Delta cat-2$  no presenta diferencia en el crecimiento radial con respecto a la cepa silvestre. Se inocularon aproximadamente mil conidios en el centro de una caja Petri con medio mínimo VS. Los cultivos crecieron a 30°C en la oscuridad y se tomó medida cada 4 horas a partir de las 12 horas de inoculación. Los valores obtenidos provienen de tres determinaciones independientes.

Asimismo, se evaluó el crecimiento de estas cepas en medio líquido usando sustratos en los que hay inducción de la CAT-2, tales como etanol (4%), metanol (4%), acetato de potasio (40 mM) y ácido oléico (0.5%), todos en presencia de baja concentración de glucosa (0.2%). Tampoco se encontraron diferencias en el crecimiento con estos sustratos. Cabe notar que el crecimiento del hongo es muy lento en medio con etanol, acetato de potasio o con metanol y se obtiene muy poca biomasa. El crecimiento es mejor en ácido oléico.

## II. Mutantes monofuncionales de CAT-2

### II.1. Integración dirigida de *cat-2* y *cat-2W90A* en el locus de *his3*

En varias CP bacteriales se han generado mutaciones que cancelan la actividad de catalasa pero no la actividad de peroxidasa. Decidimos generar una de estas mutaciones en el gen *cat-2* para obtener una CAT-2 monofuncional con la cual complementar una mutante nula de *cat-2* de *N. crassa*. Se sustituyó el triptofano 90 por alanina en el gen *cat-2* mediante el procedimiento de mutagénesis dirigida (Figura 14) descrito en materiales y métodos, por el cual obtuvimos el plásmido pCP7 (ver anexo) que lleva el gen de *cat-2* con la mutación deseada.



**Figura 14 Sustitución W90A en *cat-2*.** Se generó la sustitución W90A en el gen *cat-2* y se secuenció para verificar la presencia de la mutación deseada.

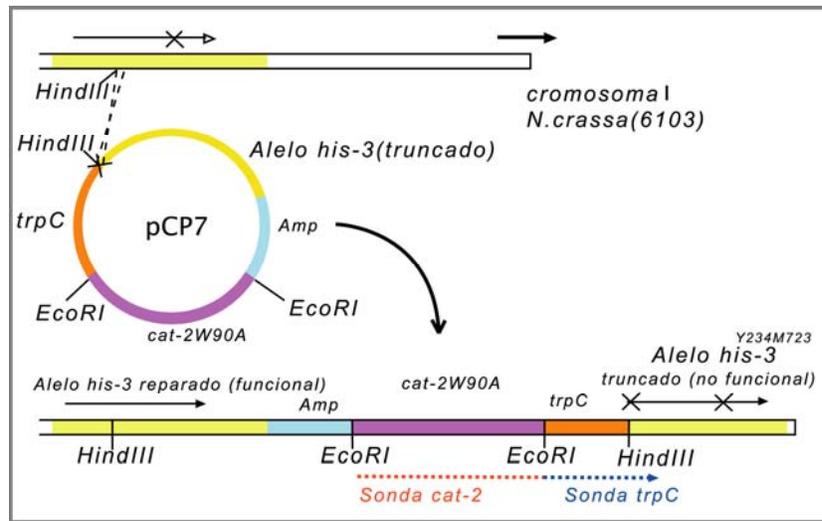
El plásmido pCP7 se utilizó para transformar una cepa *cat-2<sup>RIP</sup>*; *his3<sup>-</sup>* de *N. crassa* y para dirigir la integración ectópica de una copia del gen *cat-2W90A* al locus de *his3* en el cromosoma I. En la Figura 15 se muestra el evento de integración esperado. Se obtuvieron 17 cepas transformadas que se seleccionaron por la pérdida de la auxotrofia para histidina.

De manera paralela, utilizando este mismo procedimiento, se usó el plásmido pCP5 para complementar la cepa *cat-2<sup>RIP</sup>; his3<sup>-</sup>* con el gen silvestre. De esta transformación se seleccionaron nueve cepas transformadas protótrofas de histidina.

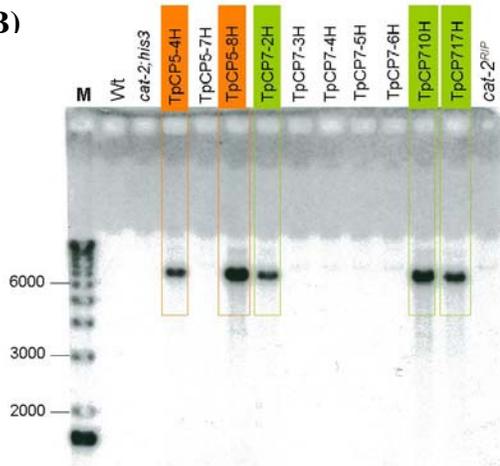
Debido a que la transformación con los plásmido pCP5 y pCP7 se llevó a cabo con conidios, que son células multinucleadas, se hicieron cuatro resiembras a partir de una colonia aislada para asegurar el estado homocariote de las cepas transformadas. Posteriormente, las veintiséis cepas seleccionadas por la pérdida de la auxotrofia para histidina se analizaron por hibridación tipo “Southern”. Al hibridar el ADN genómico digerido con la enzima *EcoRI* con la sonda *trpC* (Figura 15-A) se encontraron cinco cepas que mostraron el patrón de hibridación esperado, que consiste en una banda de 6.8 kb (Figura 15-B). Además, se corroboró la integración dirigida de *cat-2* y de *cat-2W90A* al hibridar el ADN genómico con la sonda *cat-2*. Con esta sonda se obtiene un patrón de dos fragmentos: uno correspondiente al gen endógeno y otro de 3.6 kb correspondiente a la copia integrada de *cat-2* o de *cat-2W90A* (Figura 15-C).

Los resultados muestran que las cepas TpCP5-4H, TpCP5-8H, TpCP7-2h, TpCP7-10H y TpCP7-17H tuvieron el evento de integración esperado.

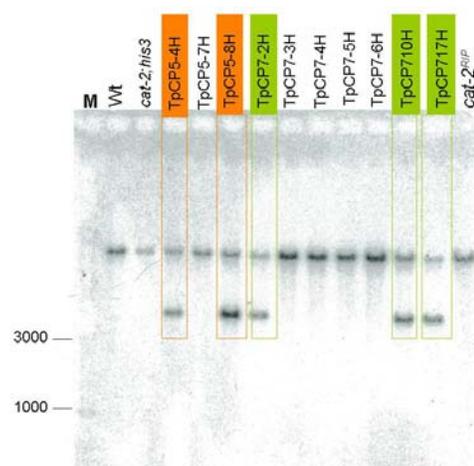
A.



B)



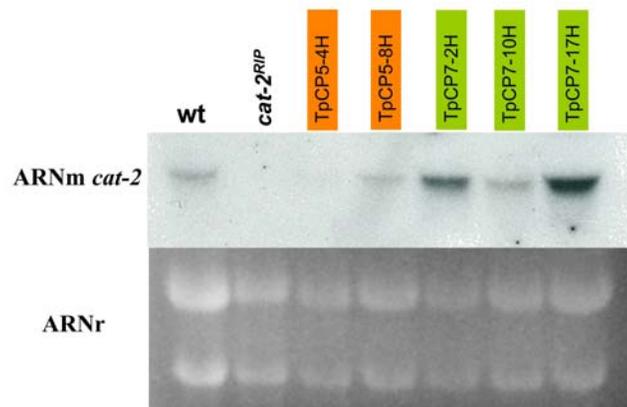
C)



**Figura 15 Integración dirigida de *cat-2* y de *cat-2W90A* en el locus de *his3* de *N. crassa*.** La cepa *cat-2; his-3*<sup>-</sup> (6103) se transformó con el plásmido circular pCP5 y con el plásmido pCP7. **A)** Esquema del evento de integración esperado y de las sondas utilizadas. **B y C)** Se aislaron cepas homocariotes a partir de las cepas transformadas. Se purificó el ADN genómico de las mismas, se digirió con la enzima *EcoRI* y se analizó por hibridación tipo "Southern". **B)** Para la hibridación se empleó como sonda el fragmento *EcoRI-XbaI* del plásmido pCP7 (710 pb) indicado en la figura 1A, que corresponde al gen *trpC*. Se compara el patrón de hibridación con el de una cepa silvestre (wt) y de la cepa parental *cat-2*<sup>RIP</sup>; *his3*<sup>-</sup>. **C)** La sonda empleada fue el fragmento *BglII* del plásmido pCP7 (777 pb) indicado en la figura 1A que corresponde al gen *cat-2*. Se compara el patrón de hibridación con el de una cepa silvestre (wt), la cepa parental *cat-2*<sup>RIP</sup>; *his3*<sup>-</sup> y la cepa *cat-2*<sup>RIP</sup>. Cinco cepas mostraron el patrón esperado, dos con *cat-2* (naranja) y tres con *cat-2W90A* (verde).

## II. 2. La acumulación del ARNm *cat-2* en las cepas transformadas con *cat-2* y con *cat-2W90A*

Para asegurar que el gen *cat-2W90A* se estuviera expresando en las cepas transformadas, se evaluó la acumulación del ARNm *cat-2* por hibridación de tipo “Northern”. Como se observa en la Figura 16. Todas las cepas transformadas expresaron el ARNm *cat-2*.



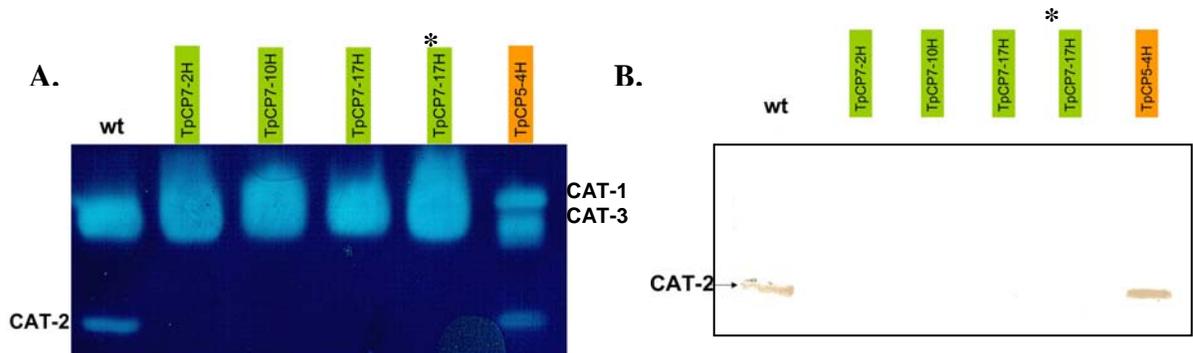
**Figura 16** El ARNm *cat-2* sí se expresa en las cepas transformadas con *cat-2* o con *cat-2W90A*. Se hizo crecer *N. crassa* en medio VS líquido hasta la fase de crecimiento estacionario tardía (96hrs). Se extrajo el ARN total y se analizó mediante una hibridación de tipo “Northern”. Se compara el patrón de hibridación con el de una cepa silvestre (wt) y con el de una cepa mutante sin *cat-2* (*cat-2<sup>RIP</sup>*). Cepas transformadas con el gen *cat-2* (naranja). Cepas transformadas con *cat-2W90A* (verde).

## II. 3. La actividad de catalasa y de peroxidasa de la CAT-2 en las cepas transformadas con *cat-2* y con *cat-2W90A*

La actividad de la CAT-2 aparece durante la etapa de crecimiento estacionario tardío (96 horas) en cultivos líquidos (Peraza, 2005). Por tanto, decidimos obtener proteína total a partir del micelio crecido en estas condiciones para evaluar las actividades de catalasa y de peroxidasa de la CAT-2 de las cepas transformadas con *cat-2* y *cat-2W90A*.

En la figura 17-A y 17-B se muestra un zimograma en el que se observa que la cepa TpCP5-4H transformada con *cat-2* silvestre recuperó las actividades de catalasa y de peroxidasa de la CAT-2. Al analizar las actividades de la CAT-2 en las

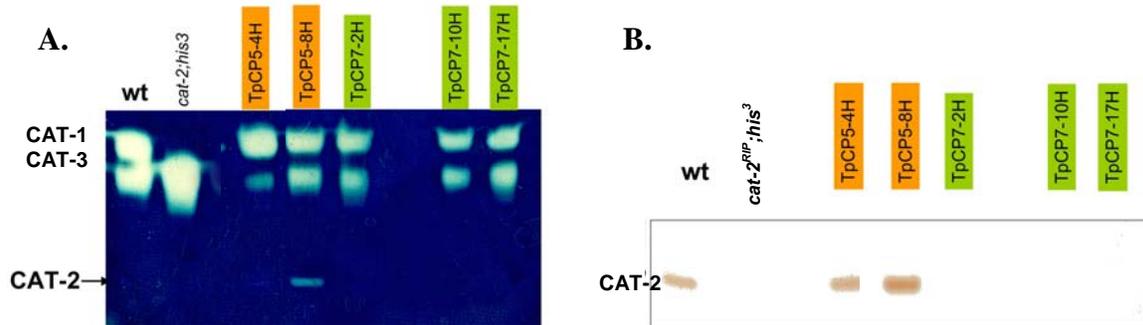
cepas que integraron *cat-2W90A* (TpCP7-2h, TpCP7-10H y TpCP7-17H) se encontró que la CAT-2 de estas cepas carece de la actividad de catalasa (Figura 17-A). Al evaluar la actividad de peroxidasa en zimogramas de actividad con *o*-dianisidina tampoco se detectó la actividad de peroxidasa en estas cepas (Figura 17-B). Para estos experimentos se utilizó como control el extracto de una cepa silvestre (wt).



**Figura 17 Actividad de catalasa y de peroxidasa en las cepas transformadas con *cat-2* y con *cat-2W90A*.** Las cepas transformadas se incubaron en medio líquido hasta la fase de crecimiento estacionario tardío. Se extrajo la proteína total y se separó mediante electroforesis en gel de acrilamida y se analizaron las actividades de la CAT-2 mediante zimogramas. **A)** Actividad de catalasa (200 µg de proteína total). **B)** Actividad de peroxidasa con *o*-dianisidina [0.5 mM] y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [0.1 mM] (200 µg de proteína total). Cepas transformadas con *cat-2* (naranja), cepas transformadas con *cat-2W90A* (verde). (\*) indica 300 µg de proteína.

#### II. 4. La actividad de catalasa y de peroxidasa de la CAT-2 en cultivos que han crecido en metanol

Decidimos analizar la actividad de la CAT-2 en las cepas transformadas con *cat-2* y con *cat-2W90A* en una condición en la que la actividad de la enzima aumenta. Para ello se hicieron crecer las cepas transformadas en medio VS con metanol cuyo metabolismo se sabe induce la actividad de la CAT-2. Aún en estas condiciones las cepas complementadas con *cat-2W90A* carecen de las actividades de catalasa (Figura 18-A) y de peroxidasa (Figura 18-B).



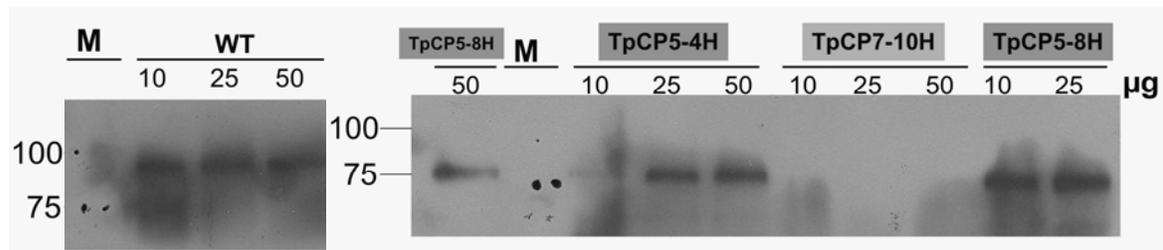
**Figura 18 Actividad de catalasa y de peroxidasa en las cepas transformadas con *cat-2* y con *cat-2W90A*.** Las cepas transformadas se incubaron en medio líquido VS con metanol hasta la fase de crecimiento estacionario tardío. Se extrajo la proteína, se separó mediante electroforesis y se analizaron las actividades de la CAT-2 mediante zimogramas. **A)** Actividad de catalasa (200  $\mu$ g de proteína total). **B)** Actividad de peroxidasa con *o*-dianisidina [0.5 mM] y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [0.1 mM] (200  $\mu$ g de proteína total). Cepas transformadas con *cat-2* (naranja), cepas transformadas con *cat-2W90A* (verde). Control negativo: cepa *cat-2<sup>RIP</sup>;**his*<sup>3</sup>

Se secuenció la región correspondiente al ORF de *cat-2W90A* para asegurar que la secuencia del gen *cat-2W90A* integrado no tuviera otra mutación además de la inducida por la mutagénesis que pudiera afectar la funcionalidad de la CAT-2. Para secuenciar se utilizó ADN genómico extraído de la cepa TpCP7-17H. En la secuencia no se encontró ninguna mutación adicional a la inducida por el proceso de mutagénesis.

## II. 5. La acumulación de CAT-2 en las cepas transformadas con *cat-2* y con *cat-2W90A*

Se evaluó la acumulación de la proteína en las cepas transformadas con *cat-2* y *cat2W90A* por inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-CAT-2. El experimento se realizó utilizando extractos de proteína obtenidos a partir de cultivos líquidos crecidos hasta la etapa tardía del crecimiento estacionario. Como se observa en la Figura 19, en las cepas transformadas con *cat-2* hay acumulación de la proteína pero no en la cepa transformada con *cat-2W90A* (TpCP 10H). Aunque no se muestra en la figura, en las cepas TpCP7-12H y TpCP17H ocurrió lo mismo. Estos resultados sugieren que, aunque se transcribe el gen mutado, la sustitución del

triptofano distal por alanina en la enzima de *Neurospora* afectó la traducción o el plegamiento de la proteína.

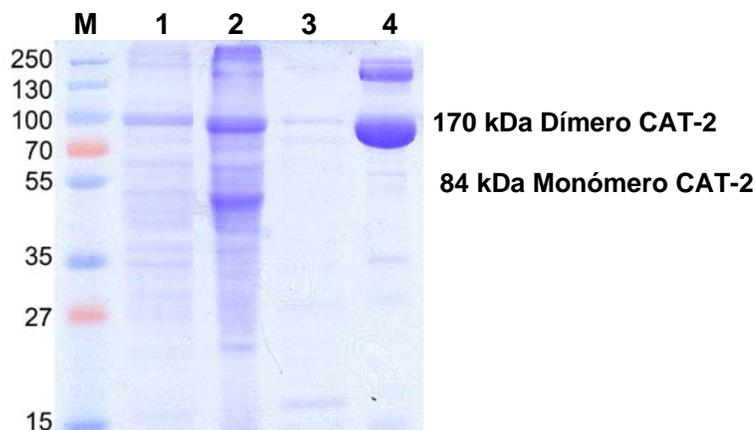


**FIGURA 19. No hay acumulación de la CAT-2 en las cepas complementadas con *cat2-W90A***  
Análisis de inmunodetección con anticuerpos policlonales dirigidos contra la CAT-2. Se utilizó como control positivo un extracto total de la cepa silvestre (WT). **M**: estándar de peso molecular. Cepas complementadas con *cat-2* (naranja), cepa transformada con *cat-2W90A* (verde).

## II. 6. Purificación de la CAT-2 expresada en *E. coli*

Expresamos la CAT-2 en *E. coli* y la purificamos. Esta enzima nos sirve de control con el cual comparar el efecto de las mutantes en los siguientes experimentos. La enzima tiene unida una etiqueta de seis histidinas en el extremo N-terminal, que facilita su purificación por su unión a una matriz de Ni-NTA. Se prepararon extractos de proteína total proveniente de cultivos inducidos con 1 mM de IPTG y hemina 30 µM durante 6 horas. El primero paso de purificación comprendió la precipitación de las proteínas del extracto total con acetona, seguido de centrifugación y recuperación de las proteínas solubles. Posteriormente, las proteínas solubles se cargaron a una columna de níquel.

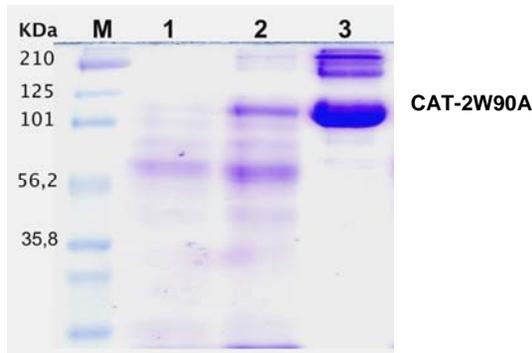
Con este procedimiento se logró una buena purificación de la CAT-2. Sin embargo, el procedimiento no elimina completamente algunas proteínas de menor masa molecular que pueden ser fragmentos de la misma CAT-2 (ver discusión). En la Figura 20 se muestra el análisis de la proteína purificada, separada con una PAGE-SDS. En el gel se observa una banda de 84 kDa que corresponde al monómero de CAT-2 y una banda mayor a los 130 kDa que podría corresponder con el dímero de CAT-2.



**Figura 20 Purificación de la CAT-2 heteróloga.** El extracto celular proviene de un cultivo de 1 L de *E. coli*, transformada con el plásmido pQC2-3D, inducido con 1 mM de IPTG y 30  $\mu$ M de hemina. Análisis de la proteína purificada mediante SDS-PAGE. Carriles: 1: extracto total, 2: proteínas insolubles después de la precipitación con acetona, 3: proteínas solubles después de la precipitación con acetona (diluidas) 4: cromatografía de afinidad al níquel. En cada carril se cargaron 10  $\mu$ g. **M:** marcador de peso molecular.

## II. 7. La expresión del gen *cat-2W90A* en *E. coli*

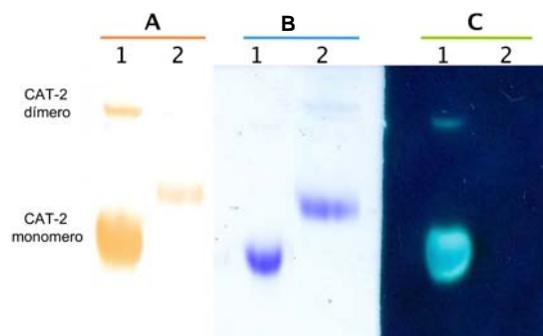
Para saber si la mutante CAT2W90A realmente no tiene actividad de peroxidasa se expresó en *E. coli* fusionada a una etiqueta de seis histidinas en el extremo amino terminal. Para la expresión se utilizó el vector de expresión pW90A-7-1 que contiene el marco de lectura abierto del gen *cat-2* con la mutación W90A. El gen *cat-2W90A* clonado en el plásmido se secuenció para verificar la ausencia de mutaciones adicionales a la mutación W90A. Para asegurar la incorporación del grupo prostético hemo durante la expresión en *E. coli*, se agregó hemina a los cultivos durante la inducción. Como se muestra en la Figura 21 con el pW90A-7-1 se obtuvo una proteína de 83 kDa que corresponde al peso de la mutante CAT-2W90A y otras de mayor peso molecular que coinciden con el peso de un dímero en incluso de un tetrámero de CAT-2.



**Figura 21 Expresión de la mutante CAT-2W90A con el plásmido pW90A-7-1** Se obtuvo un extracto de proteína total proveniente de un cultivo de 50 ml de *E. coli* transformada con pW90A-7-1 e inducido con 1 mM de IPTG durante 6 horas. Carriles: **M**, marcador de peso molecular; **1**: cultivo no inducido; **2**: cultivo inducido 6 horas con IPTG 1mM y hemina (30  $\mu$ M); **3**: CAT-2W90A purificada por cromatografía de afinidad al níquel. En cada carril se cargaron 10  $\mu$ g de proteína.

## II.8. Análisis de la actividad de catalasa y de peroxidasa en la mutante CAT-2W90A expresada en *E. coli*

La mutante CAT-2W90A expresada en *E. coli* se purificó por cromatografía de afinidad al níquel (Figura 21). Al analizar las actividades de la enzima purificada se encontró que la CAT-2W90A, como era esperado, carece de la actividad de catalasa (Figura 22-C) pero mantuvo su actividad de peroxidasa, medida con *o*-dianisidina, (Figura 22-A). Para este experimento se utilizó como control la enzima silvestre purificada. La CAT-2W90A presentó una migración electroforética diferente a la enzima silvestre (Figura 22-B), sugiriendo que la primera tiene una conformación diferente.



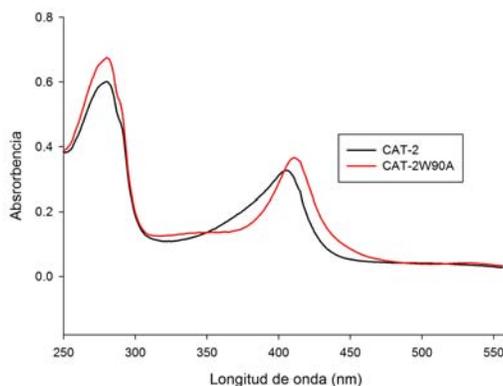
**Figura 22. La mutante CAT-2W90A expresada en *E. coli* tiene actividad de peroxidasa pero no tiene actividad de catalasa.** Se purificó la CAT-2 y la CAT-2W90A recombinantes a partir de cultivos inducidos con 1 mM de IPTG durante 5 horas con 30  $\mu$ M de hemina. Electroforesis en condiciones no

desnaturalizantes: **(A)** Actividad de peroxidasa con dianisidina; **(B)** Tinción con azul de Coomassie; **(C)** Actividad de catalasa. Carril 1: CAT-2; carril 2: CAT-2W90A.

## II.9. La mutante CAT-2W90A incorpora el grupo hemo

Para medir la incorporación del grupo hemo en la mutante CAT2W90A expresada en *E. coli*, la enzima purificada se analizó por espectrofotometría entre 280 nm y 500 nm y se comparó la cantidad del hemo en ésta con respecto a la de la enzima silvestre. En la Figura 23 se muestran los espectros de absorción de la CAT-2 y de la mutante CAT-2W90A. El espectro de absorción de la CAT-2 pura mostró un patrón con valores máximos de absorción a los 280 nm y 403 nm. El valor de 403 nm corresponde a la banda de Soret que presentan las proteínas que unen hemo. Por su parte, el espectro de absorción de la mutante CAT-2W90A tiene valores máximos de absorción a 280 nm y a 411 nm. El corrimiento en la banda de Soret indica un cambio en el ambiente químico que rodea el hemo.

El valor de  $R_z$  ( $A_{\text{Soret}}/A_{280}$ ) indica la cantidad de hemo unido por subunidad. El valor de  $R_z$  encontrado para la CAT-2 fue de 0.53, mientras que para la CAT-2W90A fue 0.54. Ambos coinciden con los valores de  $R_z$  reportados para otras CP, que suele ser alrededor de 0.5. Esto indica que la cantidad de hemo unido en la enzima es alrededor de un hemo por subunidad.



**Figura 23** Espectros de absorción de la CAT-2 y de la mutante CAT-2W90A Las enzimas se analizaron por espectrofotometría entre 280 nm y 500 nm. La CAT-2 mostró un patrón con valores máximos de absorción a los 280 nm y 403 nm (línea negra). La mutante CAT-2W90A tiene valores máximos de absorción a 280 nm y 411 nm (línea roja). Condiciones: amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.8.

## II.10. La mutante R426A genera una enzima monofuncional

Otras mutaciones, que cancelan la actividad de catalasa pero no la de peroxidasa en las catalasa-peroxidasa bacterianas, son la sustitución de la tirosina, que forma parte del enlace covalente, de una arginina y de un aspartato del lado distal de hemo.

Sustituimos la arginina distal (R426) en el gen *cat-2* por una alanina usando el estuche Quick change II (STRATAGENE). El plásmido pR426A-3B se secuenció para verificar que la mutación deseada hubiese sido introducida correctamente en *cat-2* (Figura 24).

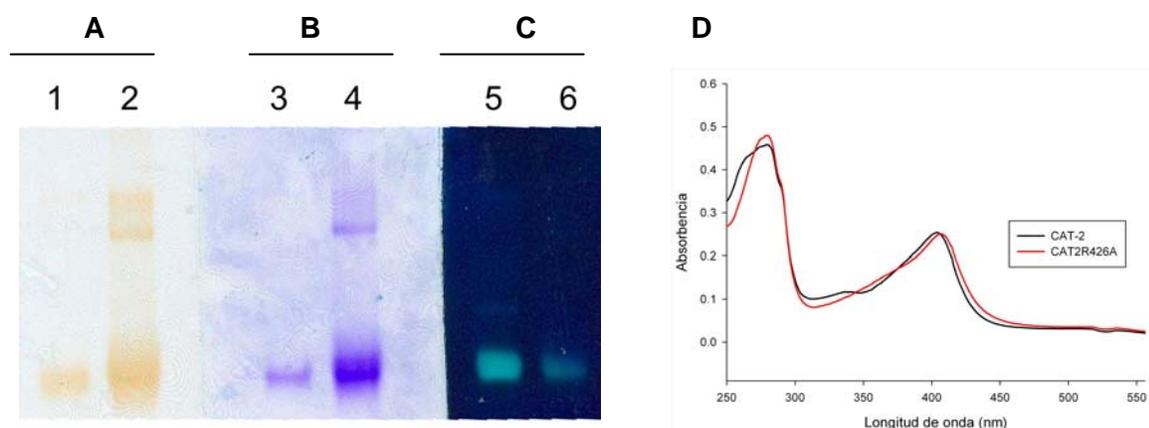


**Figura 24 Sustitución de la R426 en *cat-2*.** Se generó una mutación sitio-dirigida en el gen *cat-2* y se secuenció para verificar la sustitución de la R426 por una alanina.

Para ver el efecto de la sustitución R426A sobre las actividades de la CAT-2 se expresó la mutante en *E. coli* y se purificó por cromatografía de afinidad al níquel. En los zimogramas en los que se puso diez veces más de la enzima mutante se encontró que la CAT-2R426A tiene mucho menor actividad de catalasa (Figura 25-C) y mantiene la actividad de peroxidasa (Figura 25-A). Para estos experimentos se utilizó como control la enzima silvestre purificada (CAT-2).

Para conocer la incorporación del grupo hemo en la mutante CAT2R426A expresada en *E. coli*, la enzima purificada se analizó por espectrofotometría entre 280 nm y 500 nm y se comparó la cantidad del hemo incorporado con la enzima silvestre. El espectro de absorción de la CAT-2 pura mostró un patrón con valores máximos de absorción a 280 nm y a 403 nm (Figura 25-D). Por su parte, el espectro de absorción de la mutante CAT-R426A mostró un patrón de absorción con valores máximos de absorción a 280 nm y a 407 nm. El valor de  $R_z$  encontrado para la CAT-2 fue de 0.55

y para la CAT-2R426A de 0.52. Ambos valores coinciden con los  $R_z$  reportados para otras CP, que suele ser alrededor de 0.5.



**Figura 25** La mutante CAT-2R426A expresada en *E. coli* tiene actividad de peroxidasa pero tiene menor actividad de catalasa que la CAT-2. **(A)** Actividad de peroxidasa con dianisidina; **(B)** Tinción con azul de Coomassie; **(C)** Actividad de catalasa. **Carriles 1, 3 y 5:** CAT-2 (1  $\mu$ g); **carriles 2, 4, 6:** CAT-2R426A (10  $\mu$ g). **(D)** Espectros de absorción de la CAT-2 y de la mutante CAT-2D120A.

### III. Determinación del aducto covalente W-Y-M en la CAT-2

En las estructuras cristalográficas conocidas de las catalasa-peroxidosas se ha observado que en la cavidad distal del hemo hay un triptofano unido covalentemente a una tirosina que a la vez está unida a una metionina (Bertrand *et al.*, 2004a; Carpena *et al.*, 2003; Ghiladi *et al.*, 2005a; Yamada *et al.*, 2002). Estos aminoácidos se conservan en todas las catalasa-peroxidosas bacterianas conocidas. Se supone que las mismas relaciones estructura-función encontradas en las CP bacterianas son válidas para los dominios de las enzimas eucariotes. Por eso, es probable que la CAT-2 y otras catalasa-peroxidosas tengan también dicha unión.

Para determinar si la CAT-2 tiene la unión covalente entre el triptofano 90 (W90), la tirosina 238 (Y238) y la metionina 264 (M264), parte de la CAT-2 purificada se trató con tripsina y se determinó la masa de los péptidos obtenidos. En la Figura 26-1 se muestran los péptidos que participan en la formación del aducto covalente. Como puede observarse, cada uno de los residuos clave del aducto (W 90, Y 238 y

M 264) se localiza dentro de un fragmento tríptico distinto (péptidos **a**, **b** y **c**), cuya masa monoisotópica es de 1179.318 Da, 3276.665 Da y 2078.342 Da, respectivamente.

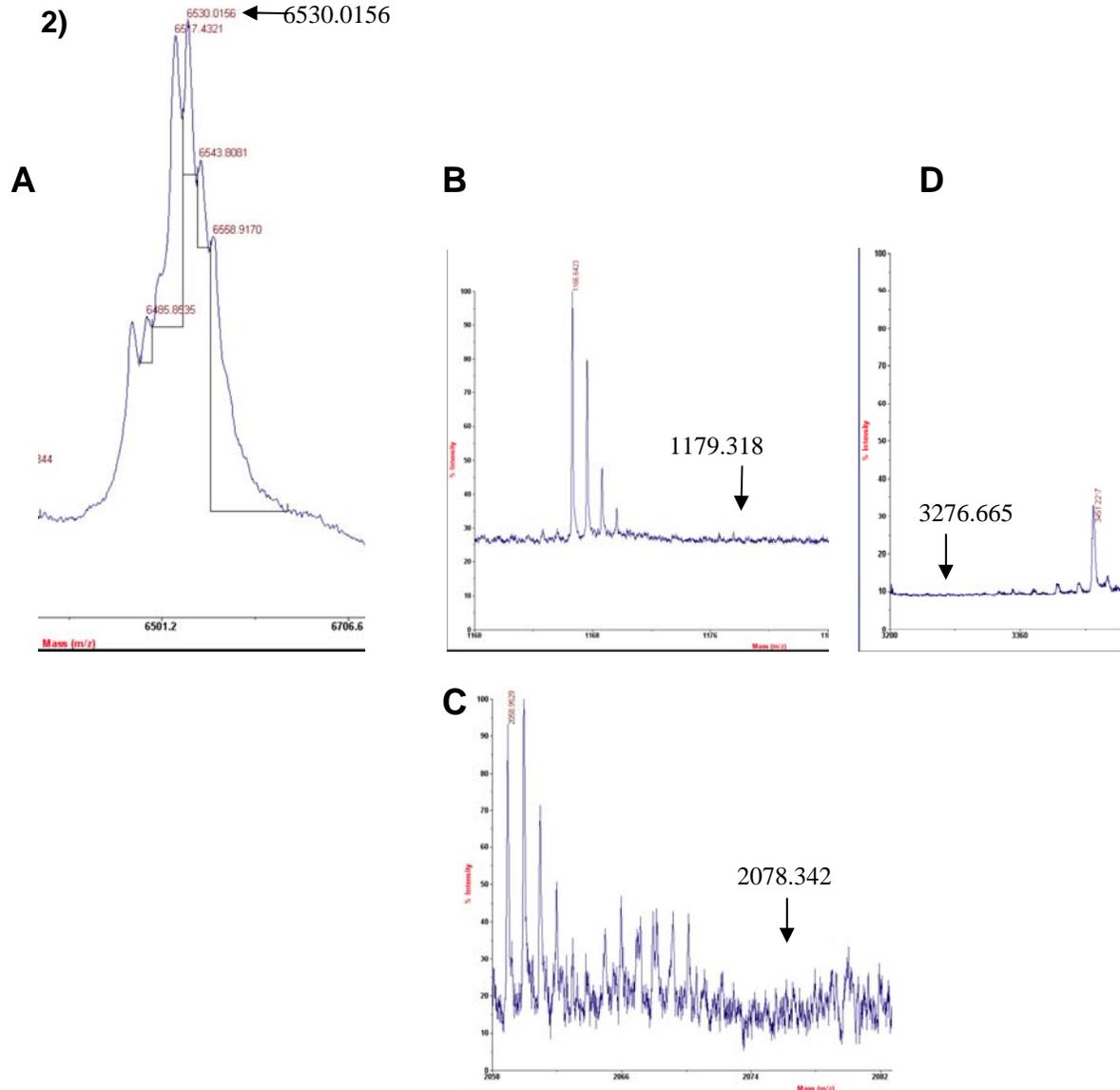
En la determinación de la masa de los péptidos obtenidos de la digestión con tripsina no se encontraron picos con la masa esperada de los péptidos a, b o c (Figura 26-2B, C y D). En cambio sí se identificó un péptido compuesto por la suma de los tres péptidos que tienen los aminoácidos unidos de manera covalente, dando una masa de 6,530.3 Da (Figura 26-2A). Esto indica que toda la proteína tiene el aducto.

Como el pico con la masa del aducto no se separó completamente, se corroboró la presencia del aducto covalente mediante un análisis en el que se empleó la técnica de espectrometría de masas utilizando un espectrómetro "Orbitrap". Dicho aparato proporciona datos más precisos y tiene un alto poder de resolución. La masa isotópica del péptido es de 6527.0842. La relación masa/carga predicha con un estado de carga de +9 es de  $725.12 + 1.0079 = 726.1279$ . La presencia del pico cuya masa monoisotópica es 726.13 y un estado de carga de +9 corrobora la presencia del tripéptido (Figura 27).

1)

Péptido a:	97 <b>MAW</b> HSAGTYR106	10	1179.318
Péptido b:	255DLQSPLASSHMGLI <b>Y</b> VNPEGPDGIPDPVASAK286	32	3276.665
Péptido c:	283 <b>MAM</b> NDEETVALIAGGHSFGK302	20	2078.342

Unión de los primeros dos péptidos = 4,456 (-2) = 4,452.0  
 Unión de los tres péptidos = 6,534.33 (-4) = 6,530.3



**Figura 26 La CAT-2 tiene el aducto covalente W-Y-M. 1) Péptidos trípticos de CAT-2 esperados. El W90, la Y238 y la M264 se muestran en negritas. Las líneas indican la unión covalente entre los péptidos a, b y c 2) La presencia de un pico de 6530 (A) y la ausencia total de picos con masas de 1179 (B), 2078 (C) y 3276 (D) denotan que toda la CAT-2 tiene el aducto W-Y-M. Las flechas en B, C y D, indican la región en la que se esperaba observar los picos de 1179, 2078 y 3276.**

OT08-1874 #13474 RT: 69.89 AV: 1 NL: 3.18E5  
T: FTMS + p NSI Full ms [400.00-2000.00]

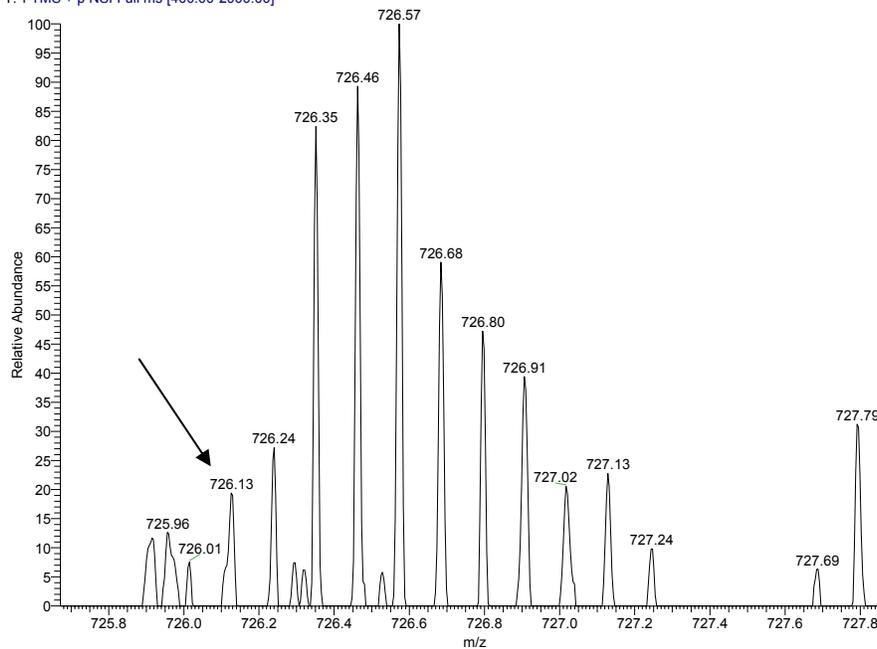


Figura 27 Determinación del aducto covalente (W-Y-M) en la CAT-2 en un espectrómetro Orbitrap. La presencia del pico con la relación masa/carga esperada de 726.13 para un estado de carga de +9, corrobora la presencia del tripéptido.

## DISCUSIÓN

### Efectos de la ausencia de la CAT-2 en el desarrollo asexual de *N. crassa*

En términos generales se sabe poco sobre la función de las CP de hongos. La mayoría de hongos filamentosos tienen un gen que codifica para una CP intracelular y sólo algunos tienen dos genes, una CP intracelular y otra extracelular (Zamocky *et al.*, 2009b). En los casos estudiados, las mutantes nulas de la catalasa-peroxidasa generan un fenotipo sutil. En el hongo *Aspergillus nidulans* se expresa la CP en las células "nodriza" que rodean al cuerpo fructífero (cleistotecio) pero la cancelación del gen no afecta la reproducción sexual del hongo (Scherer *et al.*, 2002). Recientemente, en el hongo fitopatógeno *Magnaporthe oryzae* se identificó que la CP extracelular es importante para desechar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acumulado en las células epidérmicas del hospedero durante la etapa temprana de la infección pero no lo es para la patogenia del hongo (Tanabe *et al.*, 2011).

La formación de conidios en *N. crassa* se puede inducir en cultivos líquidos después de privar al hongo de carbono o de nitrógeno (Muller, 1989). Este proceso ocurre en la etapa del crecimiento estacionario, cuando se induce la catalasa peroxidasa. Peraza, (2005) observó una diferencia en el número de conidios que produce la cepas *cat-2<sup>RIP</sup>* con respecto a los de la cepa silvestre cuando el hongo crece en ácido oléico como fuente de carbono. En este trabajo se corroboró que el número de esporas que se forman en medio líquido es mayor en las mutantes nulas de *cat-2* (*cat-2<sup>RIP</sup>* y  $\Delta$ *cat-2*) que en la cepa silvestre. Sin embargo, los valores de la desviación estándar indican que las diferencias observadas no son significativas. Los valores de desviación estándar son tan grandes, debido a la diferencia que hubo entre el número de conidios formados en cultivos en los que el micelio se agrega con respecto a los cultivos no agregados. En los cultivos agregados se forman más conidios que en los no agregados. Cuando se tomó en cuenta el número de conidios sólo de los cultivos agregados no se encontró diferencia entre la conidiación de las cepas mutantes y la cepa silvestre. Pero la mutante  $\Delta$ *cat-2* se agregó más que la cepa silvestre. Dado que la agregación del micelio es un prerrequisito para la esporulación, la agregación explica la tendencia a la mayor conidiación sumergida en

la cepa  $\Delta cat-2$  que en la silvestre. La agregación del micelio y la inducción de los carotenos son características relacionadas con la conidiación (Muller, 1989).

La cepa  $cat-2^{RIP}$  complementada con  $cat-2$  insertado en el locus  $his-3$  (TpCP5-4H) presentó un fenotipo similar a las mutantes nulas de  $cat-2$ . Este resultado inesperado tal vez se deba a que  $cat-2$  no se exprese adecuadamente desde este locus, lo cual requiere ser analizado.

Se probó si la falta de la actividad de la CAT-2 produce una mayor expresión de otros sistemas antioxidantes como los carotenos. Los carotenos son eficientes para inactivar el  $^1O_2$ . En *N. crassa* los carotenos se sintetizan en respuesta a la luz azul, a través de los factores de transcripción WC-1 y WC-2, y de manera independiente de la luz y de los factores WC durante la conidiación (Bramley and Mackenzie, 1988). El nivel intracelular de las especies reactivas del oxígeno afecta la síntesis de carotenos que es inducida con la luz y con la conidiación. Así, por ejemplo, en la mutante  $\Delta cat-3$  hay un aumento de la conidiación y de la síntesis de carotenos en las colonias crecidas bajo iluminación (Michan *et al.*, 2003). Este mismo fenotipo se observa en una mutante que carece de la superóxido dismutasa (Yoshida y Hasunuma, 2004).

En el caso de la cepa  $\Delta cat-2$  la acumulación de los carotenos en condiciones en las que se induce la enzima fue similar a la de la cepa silvestre. Estos resultados indican que cuando mutante  $\Delta cat-2$  crece en medio líquido no se forma una mayor cantidad de ERO que en la cepa silvestre, probablemente porque la ausencia de la CAT-2 este compensada por otras enzimas antioxidantes del hongo. En el genoma de *N. crassa* se han encontrado más de 10 enzimas que pueden descomponer el  $H_2O_2$ , entre ellas tres peroxirredoxinas, una glutatión peroxidasa, una citocromo *c* peroxidasa y otras peroxidases, las cuales difieren en su localización celular, eficiencia catalítica y afinidad por el peróxido de hidrógeno (Galagan, *et al.*, 2003). Las dos catalasas monofuncionales grandes de *N. crassa* tiene un papel específico en la eliminación del  $H_2O_2$  generado en las diferentes etapas de la conidiación y responden de manera diferente a las diversas condiciones de tensión. El aumento de la CAT-3 está relacionado con las condiciones de tensión que el hongo puede compensar para continuar el crecimiento (Michan *et al.*, 2003). En cambio la CAT-1

está relacionada con las situaciones de tensión en las condiciones que impiden el crecimiento y favorecen la formación de estructuras celulares de resistencia. Cada una desempeña una función específica en el hongo. Es posible que en un fondo genético que tenga menores defensas antioxidantes, por ejemplo, en una mutante doble  $\Delta cat-2$ ;  $\Delta cat-3$ , o en una que carezca de una de las peroxidases, se pueda ver más acentuado el fenotipo producido por la falta de la CAT-2.

La acumulación de carotenos se incrementó con la aireación en ambas cepas. Estos resultados están en concordancia con la idea de que la tensión oxidante induce la síntesis de carotenos y no solamente la luz azul. La luz azul es capaz de formar oxígeno singulete y por ende constituye una condición en las que se requiere los carotenos como desactivadores del mismo. Esto mismo ocurre con el estrés oxidante recurrente del proceso de conidiación.

El fenotipo de la cepa  $\Delta cat-2$  es más evidente en cuanto a la producción de conidios en condiciones aéreas. El número de conidios producidos en la cepa  $\Delta cat-2$  es mayor que en la cepa silvestre, la diferencia es significativa aunque no es grande.

En resumen, tanto en condiciones sumergidas como en condiciones aéreas, la mutante  $\Delta cat-2$  tiene un fenotipo poco evidente. Habrá aún que analizar su efecto en el ciclo sexual y en algunas condiciones experimentales más extremas. El fenotipo poco evidente puede deberse a la redundancia de enzimas que tiene el hongo, tanto de catalasas como de peroxidases.

## **Mutantes monofuncionales de CAT-2**

### **a) La mutante W90A**

Con el objeto de obtener una CAT-2 monofuncional se generó la sustitución del residuo W90 en el gen *cat-2* empleando la técnica de mutagénesis dirigida y se complementó la mutante *cat-2<sup>RIP</sup>* con el gen mutado (*cat-2W90A*). En las CP bacterianas la sustitución del triptofano 90 por alanina cancela la actividad de catalasa pero no afecta la actividad de peroxidasa (Hillar *et al.*, 2000; Regelsberger *et al.*, 2000; Regelsberger *et al.*, 2001). En las cepas transformadas no se detectó la actividad de catalasa ni de peroxidasa de la CAT-2, analizadas en condiciones en las que se induce la enzima, como en el crecimiento estacionario o en metanol. Se

secuenció la región correspondiente al gen de *cat-2W90* y no se encontró ninguna mutación adicional que explicara la falta de funcionalidad de la CAT-2. El resultado tampoco se debe a la falta de expresión como se observa en la hibridación de tipo *Northern* con la cual se detectó el transcrito en las cepas complementadas con *cat-2W90A*. Sin embargo, la inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-CAT-2 indica que la CAT-2W90A no está presente en el extracto y por tanto, la falta de actividad de peroxidasa se puede deber a que el plegamiento de la enzima esté afectado y consecuentemente se degrade o a que la proteína mutante no se esté traduciendo.

La expresión de la CAT-2W90A en *E. coli* permitió obtener la enzima mutante purificada en cantidad suficiente para analizarla. La relación  $R_z$  (Soret/280 nm) de la CAT2-W90A fue similar a los valores reportados en la literatura para otras CP mutantes (Regelsberger *et al.*, 2000), lo que indica que la enzima mutante sí une hemo de manera adecuada. Sin embargo, la banda de Soret está desplazada en la enzima mutante con respecto a la de la silvestre de 403 a 413 nm. Dicho desplazamiento es mayor comparado con el observado para las enzimas mutantes de *E. coli* y de *Synechocystis* PCC6803 e indica que esta mutación provoca un cambio importante en el ambiente químico en la cavidad del hemo. Los zimogramas de la enzima mutante demuestran que dicha sustitución tiene el mismo efecto que en las enzimas bacterianas: cancela la actividad de catalasa pero no la actividad de peroxidasa.

La migración electroforética de la mutante CAT-2W90A es diferente de la enzima silvestre lo que indica que la mutante no tiene la conformación adecuada. En la CP de *Synechocystis* esta sustitución no causó un problema de plegamiento (Regelsberger *et al.*, 2001), pero en la de HPI de *E. coli* se han observado defectos en el plegamiento de algunas variantes, como la W105C y la H106L. En estos casos no se pudo detectar la proteína (Hillar *et al.*, 2000). Con base en estas evidencias pensamos que en *Neurospora* la enzima mutante W90A no se puede detectar porque la proteína no se traduce o porque no se estructura adecuadamente y consecuentemente se degrada o se precipita.

## **b) La mutante R426A**

Con el objeto de obtener una CAT-2 monofuncional que tenga una conformación adecuada, se generó la sustitución R426A en el gen *cat-2* y se expresó en *E. coli*. En las CP bacterianas la sustitución de la arginina por alanina cancela la actividad de catalasa pero no afecta la actividad de peroxidasa (Carpena *et al.*, 2006). La R426 forma un puente de hidrógeno con la tirosina que forma parte del aducto covalente de las CP. Se propone que esta arginina forma parte de un “switch” molecular entre dos conformaciones, una que activa la oxidación del hemo con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otra que activa la reducción del hemo con el mismo (Carpena *et al.*, 2005).

La sustitución R426A en la CAT-2 reduce significativamente la actividad de catalasa en comparación con la de la enzima silvestre pero no la actividad de peroxidasa. La relación R<sub>z</sub> de la R426A fue similar a los valores reportados en la literatura para otras CP mutantes (Regelsberger *et al.*, 2000), lo que indica que la enzima mutante une el hemo de manera adecuada.

La migración electroforética de la mutante CAT-2 R426A se asemeja a la enzima silvestre lo que indica que la mutante tiene una conformación adecuada. De manera que esta mutante monofuncional se podrá usar para complementar *N. crassa* y analizar cual de las dos actividades de la CAT-2 es la relevante.

### **La CAT-2 expresada en *E. coli***

La expresión en *E. coli* de la CAT-2 fusionada a una etiqueta de seis histidinas nos permitió purificar la enzima. El análisis en SDS-PAGE de la proteína purificada reveló una banda de 84 kDa que corresponde al monómero de la CAT-2. Esta masa coincide con la reportada para otras CP. Se observó además una banda de 170 kDa que corresponde al dímero de CAT-2. Esta masa coincide con la de otras CP diméricas de hongos compuestas por subunidades idénticas cuyo tamaño es de aproximadamente 80 kDa como la de *Penicillium simplicissimum* (Pongpom *et al.*, 2005). Cuando se saca del gel el monómero de CAT-2 y se vuelve a analizar en SDS-PAGE se observa nuevamente la forma dimérica. Lo anterior concuerda con la idea de que la forma funcional de la enzima nativa es un homodímero (Chary and Natvig, 1989; Peraza, 2005). La CAT-2 purificada y analizada mediante electroforesis

en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes, tiene actividad de catalasa y actividad de peroxidasa, tanto en la posición correspondiente al monómero como en la banda cuyo peso corresponde a un posible dímero. Se han reportado algunas CP tetraméricas en *Septoria tritici* y en *Magnaporthe grisea* (Levy *et al.*, 1992; Zamocky *et al.*, 2009a). Cabe mencionar que, cuando se sobrecarga el gel con la enzima purificada, se puede observar también una banda que corresponde a la masa del tetrámero y que también tiene actividad (dato no mostrado). Esto indica que, aunque la forma mayoritaria sea el dímero, la enzima también puede formar un tetrámero.

En la preparación de la enzima purificada se detectaron algunas bandas de menor tamaño, de 60, 35 y 30 kDa. Dado que las seis histidinas se encuentran en el N-terminal, es probable que estas bandas sean productos truncos de la proteína generados como resultado de que el uso de codones para arginina y para prolina en *E. coli* es diferente al de *N. crassa*. En la secuencia de *cat-2* el 53.48% de los codones para prolina son codificados por CCC mientras que en *E. coli* este codón se usa en promedio sólo en el 12% de los casos. Asimismo el 7.89% de los codones para arginina son codificados por AGG mientras que en *E. coli* este codón se usa en menos del 2% de los casos. La presencia consecutiva de estos codones puede generar cambios en el marco de lectura (Kane, 1995; Rosenberg *et al.*, 1993). Durante la purificación de la enzima heteróloga de *M. grisea* también se obtienen bandas de menor tamaño y se propone que son producto de degradación proteolítica (Zamocky *et al.*, 2009a), aunque no se puede descartar que sean productos truncos que se copurifican.

La relación  $R_z$  estuvo en el intervalo de 0.53-0.55 que es similar al encontrado para otras CP expresadas de manera heteróloga, tanto bacterianas como de hongos. Dicho valor, se interpreta como una unión del hemo al 100% (Jakopitsch *et al.*, 1999; Zamocky *et al.*, 2009a). Estos valores indican que el sitio activo de las CP bacterianas y de eucariotes debe ser similar.

El patrón de absorción de la CAT-2 pura mostró una banda de Soret a 403 nm. De las CP de hongos que se han aislado la de *P. simplicissimum* y la de *M. grisea*

tienen una banda de Soret a 407 y 408 respectivamente. Se publican valores muy similares para otras CP bacterianas (Smulevich *et al.*, 2006).

En resumen, el método de purificación realizado permitió hacer una buena purificación de la CAT-2. Sin embargo hace falta eliminar las bandas de menor tamaño. La CAT-2 pura servirá para obtener cristales y determinar su estructura.

### **El aducto covalente W-Y-M en la CAT-2**

El mecanismo catalítico de la actividad de catalasa y de peroxidasa en las CP son motivo de estudio intenso y de una discusión activa. La presencia de dos enlaces covalentes entre las cadenas laterales de tres aminoácidos, Trp90, Tyr238 y la Met264 (numeración de la CAT-2), parecer ser común en todas las CP. Este aducto no está presente en otras peroxidases. La sustitución del triptofano (Hillar *et al.*, 2000; Regelsberger *et al.*, 2001), la tirosina (Yu *et al.*, 2003) o la metionina (Ghiladi *et al.*, 2005b; Jakopitsch *et al.*, 2004) disminuyen o anulan la actividad de catalasa en las CP mientras que la actividad de peroxidasa no se afecta o incluso aumenta.

La identificación del aducto se dedujo primero de los mapas de densidad electrónica de las CP de *H.marismortui* y *B. pseudomallei* y posteriormente se probó su existencia utilizando espectrometría de masas en las CP de *Burkholderia pseudomallei*, de *Synechocystis* PCC 6803 (Jakopitsch *et al.*, 2003a) y de *Mycobacterium tuberculosis* (Ghiladi *et al.*, 2005a). Su formación depende de la presencia del triptofano, ya que el enlace entre el triptofano y la tirosina se forma antes que el enlace entre la tirosina y la metionina (Ghiladi *et al.*, 2005a). En este trabajo se empleó la digestión triptica de la CAT-2 en combinación con la espectrometría de masas para identificar la presencia de un péptido que contuviera el enlace covalente W-Y-M. El análisis de espectrometría de masas demostró que el aducto W-Y-M de la cavidad distal del hemo también está presente en la enzima de *Neurospora crassa*. Hasta ahora, la presencia de este aducto en las CP de hongos se daba por hecho solo por la similitud en la estructura. Este es el primer reporte que demuestra su presencia en una CP de hongos.

## VI. CONCLUSIONES

- 1.- La mutante  $\Delta cat-2$  produce más conidios aéreos que la cepa silvestre.
- 2.- La mutante  $\Delta cat-2$  produce hace que la cepa tienda a agregarse durante el crecimiento. La conidiación sumergida está relacionada con la agregación de las hifas.
- 3.- La síntesis de carotenos está relacionada con el grado de aireación del cultivo.
- 4.- El sistema de expresión en *E. coli* permitió probar diferentes mutantes del gen *cat-2* para encontrar aquellas que generan una enzima monofuncional. Específicamente las mutantes de la arginina (R426) y del triptofano (W90) distales modifican la actividad de catalasa y mantienen la actividad de peroxidasa.
- 5.- En la cepa de *N. crassa* transformada con el gen *cat-2W90A* el gen se transcribe, pero la proteína no se traduce o se degrada.
- 6.- Al igual que en las CP bacterianas, en la CAT-2 está presente una unión covalente entre el triptofano 90, la tirosina 238 y la metionina 264.
- 7.- La expresión heteróloga de la CAT-2 activa y la purificación en una cantidad suficiente y pureza adecuada hace posible su cristalización.

## PERSPECTIVAS

- Complementar la mutante nula  $\Delta cat-2$  en su mismo sitio para tener una cepa control adecuada.
- Determinar si entre las mutantes de la Y238, el D120 o la R426 hay alguna que genere una enzima monofuncional con la que se pueda hacer la complementación en *N. crassa* y con ello estudiar cual de las actividades de la CAT-2 esta relacionada con los fenotipos de la mutante nula de *cat-2*.
- Para evitar la producción de productos trancos de la enzima durante la expresión en *E. coli* es conveniente fusionar una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal de la CAT-2.

Asimismo debemos probar la expresión de *cat-2* en la cepa de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3-RIPL) que tiene los tRNAs: AGG, AGA, AUA, CUA y CCC que se usan raramente en *E. coli*. Analizar cuantitativamente la actividad de

catalasa (oximetría) y la actividad de peroxidasa (espectrofotometría) de la mutante *R426A* expresada en *E. coli*.

- Obtener cristales adecuados para determinar la estructura de la CAT-2.

## REFERENCIAS

- Ahn, B., Rhee, S.G., y Stadtman, E.R. (1987) Use of fluorescein hydrazide and fluorescein thiosemicarbazide reagents for the fluorometric determination of protein carbonyl groups and for the detection of oxidized protein on polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **161**: 245-257.
- Baker, R.D., Cook, C.O., y Goodwin, D.C. (2006) Catalase-peroxidase active site restructuring by a distant and "inactive" domain. *Biochemistry* **45**: 7113-7121.
- Bertrand, T., Eady, N.A., Jones, J.N., Jesmin, Nagy, J.M., Jamart-Gregoire, B., Raven, E.L., y Brown, K.A. (2004a) Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase. *J Biol Chem* **279**: 38991-38999.
- Bertrand, T., Eady, N.A.J., Jones, J.N., Jesmin, Nagy, J.M., Jamart-Gregoire, B., Raven, E.L., y Brown, K.A. (2004b) Crystal Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase. *J. Biol. Chem.* **279**: 38991-38999.
- Bistis, G.N., Perkins D. D., y Red, N. D. (2003) Cell types of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. News* **50**: 17-19.
- Borkovich, K.A., Alex, L.A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G.E., Read, N.D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F.E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, J.E., Dunlap, J.C., Loros, J.J., Catcheside, D., Inoue, H., Aramayo, R., Polymenis, M., Selker, E.U., Sachs, M.S., Marzluf, G.A., Paulsen, I., Davis, R., Ebbole, D.J., Zelter, A., Kalkman, E.R., O'Rourke, R., Bowring, F., Yeadon, J., Ishii, C., Suzuki, K., Sakai, W., y Pratt, R. (2004) Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 1-108.
- Bramley, P.M., y Mackenzie, A. (1988) Regulation of carotenoid biosynthesis. *Curr Top Cell Regul* **29**: 291-343.
- Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., and Ros, J. (2000) Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 27393-27398.
- Carpena, X., Loprasert, S., Mongkolsuk, S., Switala, J., Loewen, P.C., and Fita, I. (2003) Catalase-peroxidase KatG of *Burkholderia pseudomallei* at 1.7Å resolution. *J Mol Biol* **327**: 475-489.
- Carpena, X., Wiseman, B., Deemagarn, T., Singh, R., Switala, J., Ivancich, A., Fita, I., y Loewen, P.C. (2005) A molecular switch and electronic circuit modulate catalase activity in catalase-peroxidases. *EMBO Rep* **6**: 1156-1162.
- Carpena, X., Wiseman, B., Deemagarn, T., Herguedas, B., Ivancich, A., Singh, R., Loewen, P.C., y Fita, I. (2006) Roles for Arg426 and Trp111 in the modulation of NADH oxidase activity of the catalase-peroxidase KatG from *Burkholderia pseudomallei* inferred from pH-induced structural changes. *Biochemistry* **45**: 5171-5179.
- Chary, P., y 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.
- Colussi, C., Albertini, M.C., Coppola, S., Rovidati, S., Galli, F., y Ghibelli, L. (2000) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced block of glycolysis as an active ADP-ribosylation reaction protecting cells from apoptosis. *Faseb J* **14**: 2266-2276.
- Davis, R.H., y De Serres, F.J. (1970) Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods in enzymology* **17**: 79-143.
- Davis, R.H. (2000) *Neurospora*. Contributions of a model organism. USA: OXFORD UNIVERSITY PRESS.

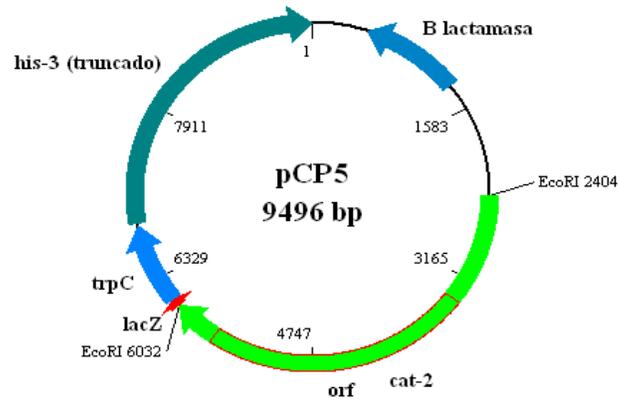
- Deemagarn, T., Wiseman, B., Carpena, X., Ivancich, A., Fita, I., y Loewen, P.C. (2007) Two alternative substrate paths for compound I formation and reduction in catalase- peroxidase KatG from *Burkholderia pseudomallei*. *Proteins* **66**: 219-228.
- Diaz, A., Horjales, E., Rudino-Pinera, E., Arreola, R., y Hansberg, W. (2004) Unusual Cys-Tyr covalent bond in a large catalase. *J Mol Biol* **342**: 971-985.
- Diaz, A., Munoz-Clares, R.A., Rangel, P., Valdes, V.J., y Hansberg, W. (2005) Functional and structural analysis of catalase oxidized by singlet oxygen. *Biochimie* **87**: 205-214.
- Diaz, A., Valdes, V.J., Rudino-Pinera, E., Horjales, E., y Hansberg, W. (2009) Structure-function relationships in fungal large-subunit catalases. *J Mol Biol* **386**: 218-232.
- Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**: 47-95.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Borkovich, K.A., Selker, E.U., Read, N.D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L.J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C.B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M.A., Werner-Washburne, M., Selitrennikoff, C.P., Kinsey, J.A., Braun, E.L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G.O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Mauceli, E., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metznerberg, R.L., Perkins, D.D., Kroken, S., Cogoni, C., Macino, G., Catchside, D., Li, W., Pratt, R.J., Osmani, S.A., DeSouza, C.P., Glass, L., Orbach, M.J., Berglund, J.A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D.O., Alex, L.A., Mannhaupt, G., Ebbole, D.J., Freitag, M., Paulsen, I., Sachs, M.S., Lander, E.S., Nusbaum, C., y Birren, B. (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* **422**: 859-868.
- Ghiladi, R.A., Cabelli, D.E., y Ortiz de Montellano, P.R. (2004) Superoxide reactivity of KatG: insights into isoniazid resistance pathways in TB. *J Am Chem Soc* **126**: 4772-4773.
- Ghiladi, R.A., Knudsen, G.M., Medzihradzsky, K.F., y Ortiz de Montellano, P.R. (2005a) The Met-Tyr-Trp cross-link in *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG): autocatalytic formation and effect on enzyme catalysis and spectroscopic properties. *J Biol Chem* **280**: 22651-22663.
- Ghiladi, R.A., Medzihradzsky, K.F., y Ortiz de Montellano, P.R. (2005b) Role of the Met-Tyr-Trp cross-link in *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) as revealed by KatG(M255I). *Biochemistry* **44**: 15093-15105.
- Ghiladi, R.A., Medzihradzsky, K.F., y Ortiz de Montellano, P.R. (2005c) Role of the Met-Tyr-Trp Cross-Link in *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase (KatG) As Revealed by KatG(M255I). *Biochemistry* **44**: 15093-15105.
- Halliwell, B., y Gutteridge, J. M. C. (1999) *Free radicals in Biology and medicine*. New York: Oxford University Press.
- Hansberg, T.W. (1996) A hyperoxidant state at the start of each developmental state during *Neurospora crassa* conidiation. *Ciencia e cultura* **48**: 64-74.
- Hansberg, W., de Groot, H., y Sies, H. (1993) Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radic Biol Med* **14**: 287-293.
- Harris, J.L., Howe, H.B., Jr., y Roth, I.L. (1975) Scanning electron microscopy of surface and internal features of developing perithecia of *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **122**: 1239-1246.
- Hillar, A., Peters, B., Pauls, R., Loboda, A., Zhang, H., Mauk, A.G., y Loewen, P.C. (2000) Modulation of the activities of catalase-peroxidase HPI of *Escherichia coli* by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **39**: 5868-5875.

- Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.M., Kira, Y., Imada, I., y Utsumi, K. (2003) Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem* **10**: 2495-2505.
- Jakopitsch, C., Ruker, F., Regelsberger, G., Dockal, M., Peschek, G.A., y Obinger, C. (1999) Catalase-peroxidase from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: cloning, overexpression in *Escherichia coli*, and kinetic characterization. *Biol Chem* **380**: 1087-1096.
- Jakopitsch, C., Regelsberger, G., Furtmuller, P.G., Ruker, F., Peschek, G.A., y Obinger, C. (2002) Engineering the proximal heme cavity of catalase-peroxidase. *J Inorg Biochem* **91**: 78-86.
- Jakopitsch, C., Kolarich, D., Petutschnig, G., Furtmuller, P.G., y Obinger, C. (2003a) Distal side tryptophan, tyrosine and methionine in catalase-peroxidases are covalently linked in solution. *FEBS Lett* **552**: 135-140.
- Jakopitsch, C., Auer, M., Regelsberger, G., Jantschko, W., Furtmuller, P.G., Ruker, F., y Obinger, C. (2003b) Distal site aspartate is essential in the catalase activity of catalase-peroxidases. *Biochemistry* **42**: 5292-5300.
- Jakopitsch, C., Ivancich, A., Schmuckenschlager, F., Wanasinghe, A., Pottl, G., Furtmuller, P.G., Ruker, F., y Obinger, C. (2004) Influence of the unusual covalent adduct on the kinetics and formation of radical intermediates in *Synechocystis* catalase peroxidase: a stopped-flow and EPR characterization of the MET275, TYR249, and ARG439 variants. *J Biol Chem* **279**: 46082-46095.
- Jakopitsch, C., Droghetti, E., Schmuckenschlager, F., Furtmuller, P.G., Smulevich, G., y Obinger, C. (2005) Role of the main access channel of catalase-peroxidase in catalysis. *J Biol Chem* **280**: 42411-42422.
- Johnsson K., King D.S., Shultz P. G. (1995) Studies on the Mechanism of Action of Isoniazid and Ethionamide in the Chemotherapy of Tuberculosis *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 5009-5010.
- Kamata, H., y Hirata, H. (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* **11**: 1-14.
- Kane, J.F. (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **6**: 494-500.
- Klotz, M.G., y Loewen, P.C. (2003) The molecular evolution of catalatic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from bacteria into eukaryota. *Mol Biol Evol* **20**: 1098-1112.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Levy, E., Eyal, Z., y Hochman, A. (1992) Purification and characterization of a catalase-peroxidase from the fungus *Septoria tritici*. *Arch Biochem Biophys* **296**: 321-327.
- Lledias, F., Rangel, P., and Hansberg, W. (1998) Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem* **273**: 10630-10637.
- Long, S., and Salin, M.L. (2000) Archaeal promoter-directed expression of the *Halobacterium salinarum* catalase-peroxidase gene. *Extremophiles* **4**: 351-356.
- Michan, S., Lledias, F., Baldwin, J.D., Natvig, D.O., y Hansberg, W. (2002) Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. *Free Radic Biol Med* **33**: 521-532.
- Michan, S., Lledias, F., y Hansberg, W. (2003) Asexual development is increased in *Neurospora crassa* cat-3-null mutant strains. *Eukaryot Cell* **2**: 798-808.
- Muller, B.T., y Russo V. R. A. (1989) Nitrogen starvation or glucose limitation induces conidiation in constantly shaken liquid cultures of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics Newsletter* **36**: 58-60.
- Nohl, H., Gille, L., y Staniek, K. (2005) Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem Pharmacol* **69**: 719-723.

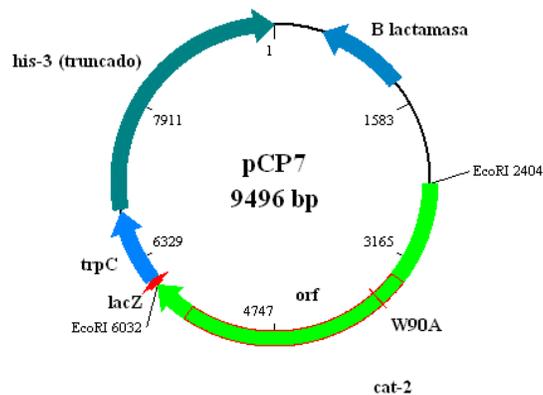
- Obinger, C., Regelsberger, G., Strasser, G., Burner, U., y Peschek, G.A. (1997) Purification and characterization of a homodimeric catalase-peroxidase from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochem Biophys Res Commun* **235**: 545-552.
- Paris, S., Wysong, D., Debeaupuis, J.P., Shibuya, K., Philippe, B., Diamond, R.D., y Latge, J.P. (2003) Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **71**: 3551-3562.
- Passardi, F., Zamocky, M., Favet, J., Jakopitsch, C., Penel, C., Obinger, C., y Dunand, C. (2007) Phylogenetic distribution of catalase-peroxidases: are there patches of order in chaos. *Gene* **397**: 101-113.
- Peraza, L. (2005) Caracterización genética y enzimática de una catalasa-peroxidasa de *Neurospora crassa*. In *Instituto de Fisiología Celular Vol. Doctorado México: Universidad Nacional Autónoma de México*, pp. 115.
- Pongpom, P., Cooper, C.R., Jr., y Vanittanakom, N. (2005) Isolation and characterization of a catalase-peroxidase gene from the pathogenic fungus, *Penicillium marneffeii*. *Med Mycol* **43**: 403-411.
- Raju, N.B. (1980) Meiosis and ascospore genesis in *Neurospora*. *Eur. J. Cell Biol.* **23**: 208-223.
- Regelsberger, G., Jakopitsch, C., Ruker, F., Krois, D., Peschek, G.A., y Obinger, C. (2000) Effect of distal cavity mutations on the formation of compound I in catalase-peroxidases. *J Biol Chem* **275**: 22854-22861.
- Regelsberger, G., Jakopitsch, C., Furtmuller, P.G., Rueker, F., Switala, J., Loewen, P.C., y Obinger, C. (2001) The role of distal tryptophan in the bifunctional activity of catalase-peroxidases. *Biochem Soc Trans* **29**: 99-105.
- Rosenberg, A.H., Goldman, E., Dunn, J.J., Studier, F.W., y Zubay, G. (1993) Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli*, demonstrated with a versatile codon test system. *J Bacteriol* **175**: 716-722.
- Rouse, D.A., DeVito, J.A., Li, Z., Byer, H., y Morris, S.L. (1996) Site-directed mutagenesis of the katG gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. *Mol Microbiol* **22**: 583-592.
- Sambrook, J., y Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sauer, H., Wartenberg, M., y Hescheler, J. (2001) Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* **11**: 173-186.
- Scherer, M., Wei, H., Liese, R., y Fischer, R. (2002) *Aspergillus nidulans* catalase-peroxidase gene (cpeA) is transcriptionally induced during sexual development through the transcription factor StuA. *Eukaryot Cell* **1**: 725-735.
- Shenton, D., y Grant, C.M. (2003) Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **374**: 513-519.
- Singh, R., Wiseman, B., Deemagarn, T., Donald, L.J., Duckworth, H.W., Carpena, X., Fita, I., y Loewen, P.C. (2004) Catalase-peroxidases (KatG) exhibit NADH oxidase activity. *J Biol Chem* **279**: 43098-43106.
- Smulevich, G., Jakopitsch, C., Droghetti, E., y Obinger, C. (2006) Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG). *J Inorg Biochem* **100**: 568-585.
- Springer M. L. y Yanofsky C. (1992) Expression of con genes along the three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. *Genes & development* **6**(6):1052-7.
- Tanabe, S., Ishii-Minami, N., Saitoh, K., Otake, Y., Kaku, H., Shibuya, N., Nishizawa, Y., y Minami, E. (2011) The role of catalase-peroxidase secreted by *Magnaporthe oryzae* during early infection of rice cells. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 163-171.
- Toledo, I., Noronha-Dutra, A.A., y 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. y Hansberg W. (1986) Aerial growth in *Neurospora crassa*: characterization of an experimental model system. *Exp Mycol* **10**: 114-125.
- Wada, K., Tada, T., Nakamura, Y., Kinoshita, T., Tamoi, M., Shigeoka, S., y Nishimura, K. (2002) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of catalase-peroxidase from *Synechococcus* PCC 7942. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 157-159.
- Welinder, K.G. (1991) Bacterial catalase-peroxidases are gene duplicated members of the plant peroxidase superfamily. *Biochim Biophys Acta* **1080**: 215-220.
- Welinder, K.G. (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* **2**: 388-393.
- Wiseman, B., Carpena, X., Feliz, M., Donald, L. J., Pons, M., Fita, I., Loewen, P. C. (2010) Isonicotinic Acid Hydrazide conversion to isonicotinyl-NAD by catalase-peroxidases. *The Journal of Biological Chemistry* **285**: 26662- 26673.
- Yamada, Y., Fujiwara, T., Sato, T., Igarashi, N., y Tanaka, N. (2002) The 2.0 Å crystal structure of catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. *Nat Struct Biol* **9**: 691-695.
- Yoshida, Y., y Hasunuma, K. (2004) Reactive oxygen species affect photomorphogenesis in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* **279**: 6986-6993.
- Yu, S., Giroto, S., Zhao, X., y Magliozzo, R.S. (2003) Rapid formation of compound II and a tyrosyl radical in the Y229F mutant of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase disrupts catalase but not peroxidase function. *J Biol Chem* **278**: 44121-44127.
- Zamocky, M., Furtmuller, P.G., y Obinger, C. Evolution of structure and function of Class I peroxidases. *Arch Biochem Biophys* **500**: 45-57.
- Zamocky, M., Regelsberger, G., Jakopitsch, C., y Obinger, C. (2001) The molecular peculiarities of catalase-peroxidases. *FEBS Lett* **492**: 177-182.
- Zamocky, M. (2004) Phylogenetic relationships in class I of the superfamily of bacterial, fungal, and plant peroxidases. *Eur J Biochem* **271**: 3297-3309.
- Zamocky, M., Furtmuller, P.G., Bellei, M., Battistuzzi, G., Stadlmann, J., Vlasits, J., and Obinger, C. (2009a) Intracellular catalase/peroxidase from the phytopathogenic rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: expression analysis and biochemical characterization of the recombinant protein. *Biochem J* **418**: 443-451.
- Zamocky, M., Furtmuller, P.G., y Obinger, C. (2009b) Two distinct groups of fungal catalase/peroxidases. *Biochem Soc Trans* **37**: 772-777.
- Zamocky, M., Furtmuller, P.G., y Obinger, C. (2010) Evolution of structure and function of Class I peroxidases. *Arch Biochem Biophys* **500**: 45-57.

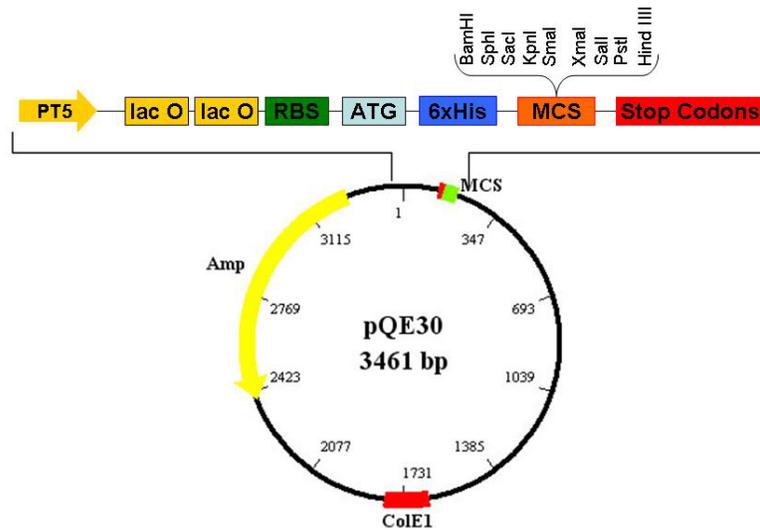
## ANEXO



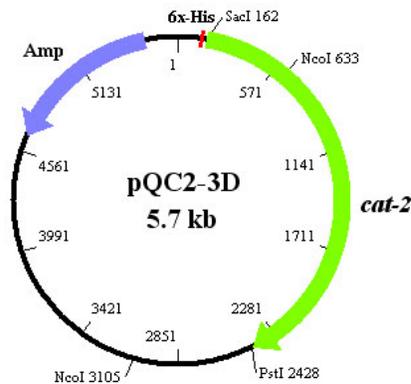
El plásmido **pCP5** fue constuido por C. Leonardo Peraza a partir del plásmido pDE-1. Este plásmido fue utilizado como molde para amplificar el ORF del gen *cat-2*. Confiere resistencia a ampicilina y contiene una copia del gen *cat-2* adyacente a un fragmento del gen *his-3*, que permite complementar una cepa *his-3<sup>-</sup>* de *N. crassa* con el alelo Y234m723.



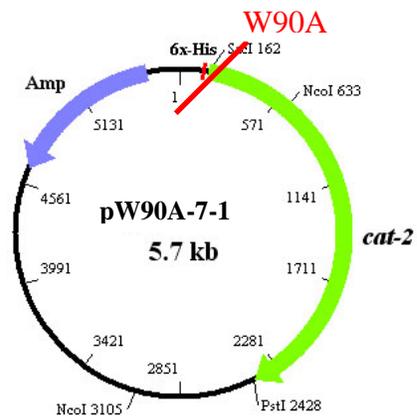
El plásmido **pCP7** fue constuido por C. Leonardo Peraza a partir del plásmido pDE-1. Este plásmido fue utilizado como molde para amplificar el ORF del gen *cat-2W90A*. Confiere resistencia a ampicilina y contiene una copia del gen *cat-2W90A* adyacente a un fragmento del gen *his-3*, que permite complementar una cepa *his-3<sup>-</sup>* de *N. crassa* con el alelo Y234m723.



El plásmido **pQE30** (QIAGEN) fue utilizado para clonar el gen *cat-2* utilizando los sitios de restricción *PstI* y *SacI* del sitio de clonación múltiple (**MCS**). Además agrega a la proteína fuisonada una etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal (**6xHis**). **PT5**: promotor T5, **lac O**: operador lac, **RBS**: sitio de unión al ribosoma, **ATG**: codón de inicio, **Stop codons**: codones de stop en los tres marcos de lectura, **Col E1**: origen de replicación Col E1, **Amp**: gen de resistencia a ampicilina.



El plásmido **pQC2-3D** se obtuvo al clonar el fragmento de 2262pb de la PCR (el cual corresponde al gen *cat-2*) en el vector pQE30. Se usó para expresar la CAT-2 en *E. coli*.



El plásmido **pW90A-7-1** se obtuvo al clonar el fragmento de 2262pb de la PCR (el cual corresponde al gen *cat-2W90A*) en el vector pQE30. Se usó para expresar la mutante CAT-2W90A en *E. coli*.