



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

LAS CATALASAS DE SUBUNIDAD GRANDE TAMBIÉN SON CHAPERONAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
TERESA BEATRIZ NAVA RAMÍREZ

TUTOR PRINCIPAL
DR. WILHELM L. HANSBERG Y TORRES
Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
Facultad de Medicina

Dr. Abraham Landa Piedra
Facultad de Medicina

Ciudad de México, febrero, 2017



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.

Agradecimientos

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Wilhelm L. Hansberg y Torres en el laboratorio 103 oriente del Departamento Biología Celular y del Desarrollo, del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante los estudios de maestría Teresa Nava Ramírez percibió una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), CVU 501149. Además contó con financiamiento del “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado” (PAEP) de la UNAM para asistir en octubre del 2015 al IX Congreso Nacional de Biología Molecular y Celular de Hongos en Puebla, México.

La parte inicial de este trabajo se realizó gracias a la subvención CB2009-132667-Q del CONACYT.

A mí Comité Tutor que asesoró el desarrollo de la investigación y estuvo constituido por:

Dr. Wilhelm L. Hansberg y Torres	Instituto de Fisiología Celular
Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina
Dr. Abraham Landa Piedra	Facultad de Medicina

A mis sinodales: Dr. Ismael Bustos Jaimes, Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, Dra. Liliana Quintanar Vera, Dr. Leonardo Peraza Reyes y Dr. Diego González Halphen, por la detallada revisión de mi trabajo y sus acertados comentarios que ayudaron a mejorarlo.

Al Dr. Pablo Rangel Silva y la M. en C. Vannesa Vega García, por su apoyo y enseñanza de las técnicas y procedimientos experimentales empleados en este trabajo.

A las técnicas académicas Martha Calahorra Fuertes y Normal Silvia Sánchez Sánchez, así como al Dr. Antonio Peña Díaz pertenecientes al laboratorio 306 oriente del IFC, por el apoyo prestado en el uso y manejo del Fluorómetro SML Aminco.

El jurado del examen de grado estuvo conformado por:

Presidente

Dr. Ismael Bustos Jaimes

Vocal

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez

Vocal

Dra. Liliana Quintanar Vera

Vocal

Dr. Leonardo Peraza Reyes

Secretario

Dr. Diego González Halphen

Índice

Lista de abreviaturas y acrónimos	1
Índice de figuras	3
Índice de tablas	5
Resumen	6
Introducción	7
1. <i>Neurospora crassa</i> como modelo de estudio	7
2. Balance redox en las células	9
3. Las hemo-catalasas monofuncionales	14
4. Las catalasas de subunidad grande de <i>N. crassa</i>	15
5. El dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande	17
6. Las superfamilias glutamina-amidotransferasa clase I y DJ-1/ThiJ/Pfpl	19
7. Las chaperonas, sus características y sus funciones	20
8. Las chaperonas de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl	21
Antecedentes	23
1. La actividad de la CAT-1 a altas temperaturas	23
2. La CAT-1 sin el dominio C-terminal	24
3. La estabilidad de la CAT-1 en diferentes condiciones	25
4. Ensayo de chaperona con la citrato sintasa	26
Hipótesis	28
Objetivos	29
Métodos	30
1. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	30
2. Plásmidos	30
3. Condiciones de crecimiento y almacenamiento de <i>E. coli</i>	31
4. Preparación de las cepas bacterianas competentes	31
5. Transformación de las cepas bacterianas con un plásmido	31
6. La cepa de <i>N. crassa</i>	32
7. Condiciones de crecimiento para <i>N. crassa</i>	32
8. Obtención de conidios de <i>N. crassa</i>	32
9. Expresión de la CAT-3 en <i>E. coli</i>	33
10. Extracción y purificación de la CAT-3	33

11. Digestión de la CAT-3 con la proteasa trombina	34
12. Purificación de la CAT-1	34
13. Digestión de CAT-1 con la proteasa subtilisina	36
14. Electroforesis de proteínas	36
15. Zimograma de actividad de catalasa	36
16. Ensayos de chaperona	37
16.1. Ensayo de chaperona usando la citrato sintasa	37
16.2. Ensayo de chaperona usando la alcohol deshidrogenasa	38
16.3. Ensayo de chaperona usando la β -galactosidasa	38
17. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos y de las estructuras	38
18. Análisis de las zonas hidrofóbicas de la superficie de las proteínas	39
Resultados	40
1. El dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande tiene algunos aminoácidos conservados	40
2. El dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande tiene una estructura semejante a las superfamilias GAT I y DJ-1/ThiJ/Pfpl	42
3. Expresión de la CAT-3 en la cepa UM2 de <i>E. coli</i>	48
4. Aislamiento del dímero de dominio C-terminal	49
5. Ensayos de chaperona	51
5.1. Ensayo de chaperona usando la citrato sintasa	51
5.2. Ensayo de chaperona usando la alcohol deshidrogenasa	53
5.3. Ensayo de chaperona usando la β -galactosidasa	55
Discusión	57
Conclusiones	63
Perspectivas	64
Referencias	65
Apéndice I	76

Lista de abreviaturas y acrónimos

β-gal	Beta galactosidasa
•OH	Radical hidroxilo
¹ O ₂	Oxígeno singulete
ADH	Alcohol deshidrogenasa
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Bm	<i>Brachyspira murdochii</i>
C	Chaperona
C50	Dímero del dominio C-terminal de la CAT-3
C63	CAT-1 sin el dominio C-terminal ni 14 aminoácidos del N-terminal
Ca	<i>Candida albicans</i>
Cat	Catalasa
CS	Citrato sintasa
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
C-terminal	Carboxilo terminal
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
Dr	<i>Deinococcus radiodurans</i>
Ec / <i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERO	Especies reactivas del oxígeno
FGSC	Fungal Genetics Stock Center
G	Glioxalasa
GAT I	Glutamina-amidotransferasa clase I
GPx	Peroxidasa de glutatión
GSH	Glutatión
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HO ₂ •	Peroxilo
Hs	<i>Homo sapiens</i>
HSP	Heat Shock Protein
Nc	<i>Neurospora crassa</i>
NOX	NADPH oxidasa
O ₂ •-	Anión superóxido
O ₃	Ozono
P	Proteasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank
Ph	<i>Pyrococcus horikoshii</i>
Pp	<i>Pseudomonas putida</i>
Pv	<i>Penicillium vitale</i>
RMSD	Root-Mean-Square Deviation
RO•	Alcoxilo
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico

sHSP	Small Heat Shock Proteins
SOD	Superóxido dismutasa
Sp	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
TF	Factor de transcripción
To	<i>Thermococcus onnurineus</i>
TX-100	Tritón X-100
U	No caracterizada
Vc	<i>Vibrio cholerae</i>
VS	Medio Vogel con sacarosa

Índice de figuras

Figura 1. Esquema del ciclo sexual y asexual del hongo <i>N. crassa</i> .	8
Figura 2. Alineamiento de la estructura de tres diferentes catalasas de subunidad grande.	18
Figura 3. Temperatura óptima de la actividad de la CAT-1.	23
Figura 4. Pérdida de la actividad de la CAT-1 debida a la disociación del dímero con la temperatura.	24
Figura 5. CAT-1 y la enzima C63 resultante de la digestión con subtilisina.	24
Figura 6. Actividad de la CAT-1 y de la enzima sin el C-terminal, C63, incubadas con diferentes detergentes o a 93°C.	26
Figura 7. Protección contra la desnaturalización con calor de la CS en presencia de la CAT-1 o de la C63.	27
Figura 8. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal de cuatro catalasas de subunidad grande.	40
Figura 9. Aminoácidos conservados del dominio C-terminal en la estructura de la CAT-3.	41
Figura 10. Fenograma de la estructura del dominio C-terminal de cuatro catalasas de subunidad grande comparada con diferentes miembros de la superfamilia GAT I.	44
Figura 11. Fenograma de la estructura del dominio C-terminal de cuatro catalasas de subunidad grande comparada con diferentes miembros de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl.	46
Figura 12. Alineamiento estructural del dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande y otras proteínas de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl.	47
Figura 13. Estandarización de la expresión de la CAT-3 en la cepa UM2.	48
Figura 14. CAT-3 purificada a partir de su expresión en <i>E. coli</i> .	49

Figura 15. Digestión de la CAT-3 con la proteasa trombina.	50
Figura 16. Aislamiento del dímero del dominio C-terminal de la CAT-3 a partir de su digestión con trombina.	50
Figura 17. Protección de la desnaturalización con calor de la CS en presencia de la CAT-3.	52
Figura 18. Protección de la desnaturalización con calor de la ADH en presencia de la CAT-1 o de la CAT-3.	54
Figura 19. Protección de la desnaturalización con urea de la β -gal en presencia de la CAT-1 o CAT-3.	56
Figura 20. Superficie hidrofóbica del dímero de C-terminal de la CAT-1 y de la CAT-3, y de otras proteínas de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl.	61
Figura 21. Zonas hidrofóbicas en la superficies de las catalasa de subunidad grande de <i>N. crassa</i> CAT-1 y CAT-3.	62
Figura suplementaria 1. Alineamiento de las 20 secuencias de las proteínas usadas en el alineamiento estructural del dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande y las proteínas de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl	76

Índice de tablas

Tabla 1. Porcentaje de similitud/identidad en la secuencia de cuatro catalasas de subunidad grande.	15
Tabla 2. Familias más estudiadas de chaperonas, sus cofactores y sus funciones (modificado de Saibil, 2013)	21
Tabla 3. Lista de las proteínas seleccionadas para el alineamiento estructural de la Figura 8.	42
Tabla 4. Lista de las proteínas seleccionadas para el alineamiento estructural de la Figura 9.	44
Tabla 5. Comparación de la actividad de chaperona entre las catalasas de subunidad grande de <i>N. crassa</i> , DJ-1 y Hsp31, en el ensayo de desnaturalización con calor de la CS.	52
Tabla 6. Comparación de la actividad de chaperona de las catalasas de subunidad grande, DJ-1 y Hsp31 en el ensayo de desnaturalización con calor de la ADH.	55

Resumen

Neurospora crassa es un hongo filamentoso perteneciente al filo Ascomycota, el cual es un excelente modelo experimental por su rápido crecimiento y fácil manejo en el laboratorio. Este hongo tiene tres tipos de hemo-catalasas: dos catalasas de subunidad grande, CAT-1 y CAT-3; una catalasa-peroxidasa, CAT-2; y una catalasa de subunidad pequeña, CAT-4. En *N. crassa* el H₂O₂ se elimina principalmente por las catalasas de subunidad grande (Díaz *et al.*, 2009). Las catalasas de subunidad grande, a diferencia de las catalasas de subunidad pequeña, tienen un dominio carboxilo terminal adicional de ≥ 150 aminoácidos (Díaz *et al.*, 2009). Este dominio es parecido a la flavodoxina y se ha considerado como miembro de dos superfamilias de proteínas, la superfamilia glutamina-amidotransferasa tipo I y la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl. El dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande presenta poca semejanza en secuencia pero gran similitud estructural entre diferentes catalasas (Díaz *et al.*, 2009). Por otra parte, este dominio es semejante en estructura a la proteína DJ-1 (Hansberg *et al.*, 2012), la cual tiene actividad de chaperona y está relacionada con la enfermedad del Parkinson (Shendelman *et al.*, 2004). Se desconoce la función del dominio C-terminal de las catalasas, aunque se ha observado que le confiere estabilidad a la catalasa HP11 de *E. coli* (Sevinc *et al.*, 1998; Chelikani *et al.*, 2003).

En el presente trabajo, se determinó que el dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande presenta una alta similitud estructural con las proteínas de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl. Se demostró que el dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande de *N. crassa* tiene actividad de chaperona, ya que evita la desnaturalización de otras proteínas con la temperatura o con la urea. Esta actividad es mayor que la de DJ-1 y de Hsp31 y es independiente de la triada catalítica presente en la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl. El dominio C-terminal de la CAT-3 protege un poco más que el de la CAT-1, a pesar de que la estructura del dominio C-terminal de esta última es más parecido a DJ-1. El dominio contribuye a dar estabilidad a las propias catalasas de subunidad grande, por ejemplo, ante la desnaturalización con calor.

Introducción

1. *Neurospora crassa* como modelo de estudio

Neurospora crassa es un hongo filamentoso perteneciente al filo Ascomycota, clase de los Ascomycetes, y se caracteriza principalmente por presentar un color anaranjado. Fue descrito por primera vez en Francia en 1843 como consecuencia de una infestación en las panaderías, por lo cual se le dio el nombre del moho rojo del pan. Posteriormente se identificó como contaminante en el procesamiento de la caña de azúcar y en la vegetación quemada (Davis, 2000). Las especies del género se clasificaron con base a las diferencias en su reproducción sexual, descritas por Shear y Dodge en 1927 (Davis, 2000). Así el nombre del género *Neurospora crassa* proviene de las ascosporas (esporas sexuales) que son grandes y presentan ornamentaciones parecidas a nervaduras (Davis y Perkins, 2002).

N. crassa tiene una amplia distribución en áreas tropicales y subtropicales, además de haber sido encontrado en algunas zonas templadas, especialmente en lugares que tienen conexión con actividades agrícolas o comerciales (Perkins y Turner, 1988). *N. crassa* es uno de los primeros colonizadores en áreas de vegetación quemada después de un incendio. Esto se puede deber a la activación con calor de las ascosporas para germinar (Davis, 2000). *N. crassa* es un hongo aerobio obligado (Perkins y Davis 2002). Se considera que no es un patógeno de plantas ni de animales, aunque hay reportes de vida endófito. Recientemente se ha observado que *N. crassa* es un endófito de la especie *Pinus sylvestris* y que se puede volver patógeno de este árbol cuando se rompe el balance de la interacción hospedero-huésped (Kuo *et al.*, 2014).

Este hongo filamentoso presenta varios tipos celulares, muchos de los cuales derivan de las células somáticas llamadas hifas, las cuales conforman la estructura fundamental de los hongos filamentosos. Al conjunto de hifas se le conoce como micelio. *N. crassa* presenta dos ciclos de vida, uno sexual y otro asexual. Es un hongo haploide, su ciclo de vida asexual se caracteriza por la germinación y crecimiento de las esporas asexuales o

conidios, resultando en hifas en crecimiento. Las hifas contienen muchos núcleos haploides, son septadas con un poro en medio del septo. Las hifas se pueden unir entre sí mediante hifas más delgadas constituyendo una colonia. Cuando la colonia detecta la falta de nutrimentos en el medio, las hifas detienen su crecimiento y se adhieren entre sí (Toledo *et al.*, 1986). A partir del micelio adherido se forma el micelio aéreo (Toledo *et al.*, 1986). Estas hifas especializadas se ramifican y posteriormente generaran conidios en sus puntas. Los conidios se dispersaran y germinan en otros sitios que tengan nutrientes disponibles (Figura 1). El ciclo de vida asexual puede ser inducido también por estímulos como la exposición al aire (Berlin y Yanofsky, 1985; Toledo *et al.*, 1986), la luz (Lauter y Russo, 1991; Davis, 2002) y en condiciones de privación de carbono y/o de nitrógeno (Weiss y Turian, 1966; Turian y Bianchi, 1972).

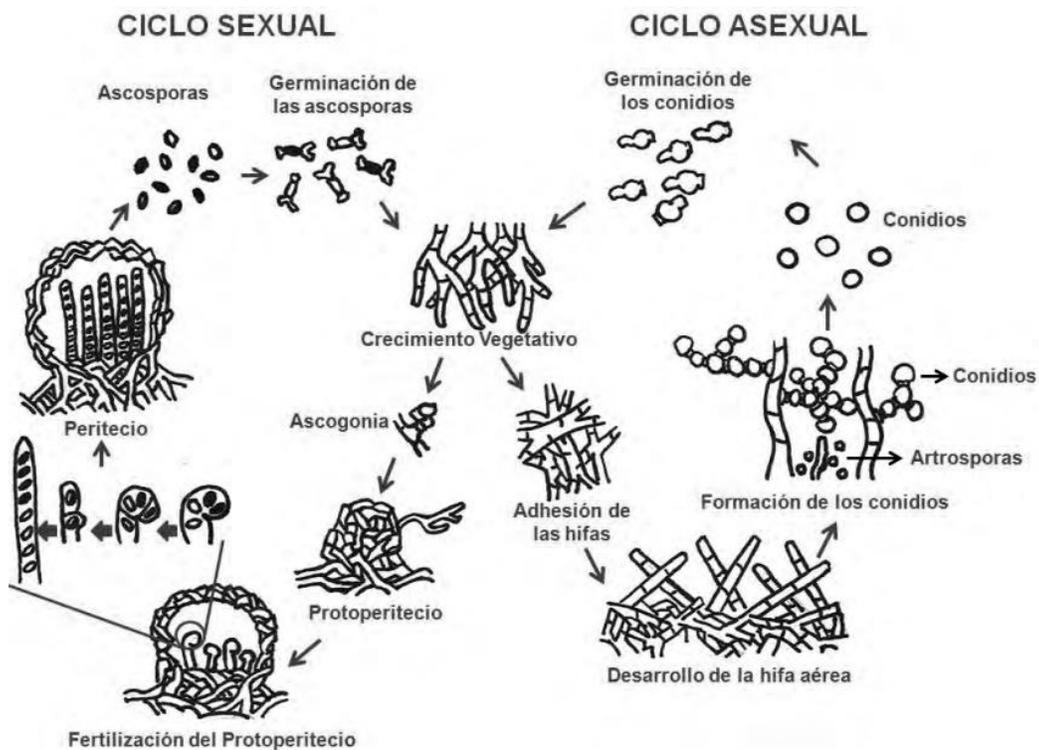


Figura 1. Esquema del ciclo sexual y asexual del hongo *N. Crassa* (Davis, 2000 modificado en Sarabia, 2016)

N. crassa es un hongo heterotálico, es decir, presenta dos tipos de sexo determinados genéticamente por los loci *mat-A* y *mat-a*. El ciclo sexual sólo ocurre cuando coinciden en el mismo sitio dos individuos de distinto sexo. Una cepa de cualquiera de los sexos puede

actuar como receptora o como donadora (Shiu P. K., & Glass N. L., 2000). El ciclo de vida sexual se puede inducir empleando un medio limitado en la fuente de nitrógeno (*Neurospora* life cycle, FGSC 2016), donde se crece la cepa receptora la cual estructura el ascogonio o gameto femenino, que es recubierto por hifas vegetativas formando así el protoperitecio. El ascogonio produce hifas tricóginas que se fusionan con una célula del sexo contrario y conducen un núcleo hacia adentro del ascogonio. El protoperitecio crece y se cubre con otras hifas dando lugar al cuerpo fructífero maduro denominado peritecio. Dentro del peritecio los núcleos femenino y masculino se replican. En un compartimento especial un núcleo de cada sexo se fusionan (cariogamia) dando como resultado una célula diploide, la cual lleva a cabo las dos divisiones meióticas seguida de una mitosis, generando así ocho ascosporas haploides contenidas en compartimentos denominados ascos (Figura 1). Las ascosporas germinan después de una inducción con alta temperatura dando lugar a nuevas colonias (Davis, 2000).

N. crassa es un excelente modelo experimental por su rápido crecimiento y fácil manejo además de que se conocen las condiciones para su crecimiento, mantenimiento e inducción de sus dos ciclos de vida en el laboratorio. Su genoma ha sido secuenciado y se cuenta con mutantes para la mayoría de sus genes, cepas que están disponibles en diferentes colecciones (Galagan *et al.*, 2003; Borkovich *et al.*, 2004).

2. Balance redox en las células

Los organismos aerobios usan el dióxígeno (O_2) en la respiración para la producción de energía. El 85 y 90% del total del O_2 que se respira se consume en la mitocondria para la generación de ATP. Para los organismos aerobios es importante mantener un consumo constante de O_2 y una fuente de electrones para reducirlo. Esta proviene de los esqueletos de carbono de los nutrimentos. No obstante el requerimiento del O_2 para la producción de energía, que es mucho más eficiente que la de la fermentación, el O_2 puede ser tóxico debido a la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO) (Hansberg, 2002).

Las ERO son moléculas derivadas del O_2 , las cuales son más reactivas que éste en su estado basal de energía (Hansberg, 2002, Konigsberg, 2008). Se consideran como ERO moléculas como el radical hidroxilo ($\bullet OH$), el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), el peroxilo (HO_2^{\bullet}) y el alcoxilo (RO^{\bullet}), así como otros compuestos como el ozono (O_3), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singulete (1O_2).

Algunas de estas ERO son producidas en las células durante el metabolismo, mientras que otras sólo pueden acceder a la célula a partir de una fuente externa (Hansberg, 2008). La mayoría de las ERO producidas en la célula se originan en la mitocondria como consecuencia de la respiración. Por ejemplo, el $O_2^{\bullet -}$ se produce principalmente en la cadena transportadora de electrones a nivel del complejo I, II y III (Brand *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2004).

Algunas enzimas pueden producir ERO como productos de sus reacciones enzimáticas, por ejemplo, el $O_2^{\bullet -}$ también puede ser formado por la actividad de la NADPH oxidasa (NOX), de la xantina oxidasa y algunas peroxidasas inespecíficas (Hansberg, 2002; Aguirre *et al.*, 2005, Konigsberg, 2008); el H_2O_2 es formado como producto de la dismutación del $O_2^{\bullet -}$ por la superóxido dismutasa (SOD), en la actividad de la xantina oxidasa, de las oxidasas de aminoácidos, de las oxidasas de hexosas, de las oxidasas de fenoles y durante la β -oxidación de los lípidos, entre otras (Dalton *et al.*, 1999; Hansberg, 2002). Además algunas ERO pueden entrar a la célula desde el entorno extracelular, por ejemplo, el H_2O_2 puede difundir a través de las membranas o acceder al citosol mediante las acuaporinas (Hansberg, 2002). Tanto el $O_2^{\bullet -}$ como el H_2O_2 son compuestos que interaccionan poco con los compuestos celulares, sin embargo, los dos son tóxicos debido a que ambos pueden formar $\bullet OH$ y 1O_2 . El H_2O_2 produce $\bullet OH$ a partir de su fragmentación al captar un electrón de un metal de transición, como el Fe (II) o el Cu (I) (reacción de Fenton), y el $O_2^{\bullet -}$ puede reaccionar con el H_2O_2 pero solo cuando la reacción es catalizada con Fe (III) (reacción Haber-Weiss) (Hansberg, 2002; Konigsberg, 2008). El $\bullet OH$ es uno de los compuestos más reactivos que existen, ya que interacciona rápidamente ($10^9 M^{-1}s^{-1}$) casi con cualquier compuesto celular (Hansberg, 2002).

Los principales daños ocasionados por las ERO en la célula son: daño al ADN a partir de la pérdida de bases, la desaminación de la citosina en uracilo y de la 5-metilcitosina en timidina, generación de la 8-hidroxiguanidina, y la ruptura de una o las dos hebras del ADN. Las ERO pueden afectar a las proteínas, que al oxidarse pueden perder su función, sobre todo cuando son oxidadas por el $\bullet\text{OH}$ y el $^1\text{O}_2$ debido a que el daño es irreversible. La oxidación de proteínas funciona como una marca para su degradación. Sin embargo, en algunos casos específicos la actividad de la proteína puede ser regulada mediante la oxidación de las metioninas o las cisteínas susceptibles al $\text{O}_2\bullet$ y al H_2O_2 . También los lípidos pueden ser dañados con las ERO, ya que, por ejemplo, el $^1\text{O}_2$ genera endoperóxidos con los ácidos grasos poliinsaturados que se descomponen en presencia de hierro, formando radicales alcoxilo que contribuyen a la propagación de la lipoperoxidación (Hansberg, 2002; Konigsberg, 2008).

Debido a la toxicidad de las ERO, las células han seleccionado una gran cantidad de mecanismos antioxidantes para convertirlas en productos menos reactivos, además de contar con sistemas de reparación y mecanismos de recambio y así protegerse del daño. Dentro de la respuesta antioxidante de las células se pueden encontrar mecanismos enzimáticos y no enzimáticos.

Algunos ejemplos de los mecanismos no enzimáticos son la producción de ascorbato, o vitamina C, el cual es un cofactor de varias hidroxilasas. Tiene dos hidroxilos ionizables que hacen de él un excelente agente reductor. Otro ejemplo es la producción de tocoferol, o vitamina E, que reacciona durante la lipoperoxidación con los radicales lipoperoxilo con la producción del radical tocoferilo. Este compuesto se puede reducir con el ascorbato y de esta manera se limita la propagación de la lipoperoxidación. El tocoferol, al igual que el ascorbato, puede reducir al Fe (III) y al Cu (II) por lo que puede ser pro-oxidante en presencia de estos metales de transición (Hansberg, 2002, Hansberg, 2008). Otro ejemplo, es la producción de carotenos, los cuales son pigmentos producidos por plantas y hongos. Cuando *N. crassa* se expone a la luz se producen los carotenos produciendo su característico color anaranjado. Los carotenos también se producen durante la conidiación del hongo, incluso en la oscuridad. El beta-caroteno forma la vitamina A, o

retinol, cuando una dioxigenasa lo parte en dos mitades, generando el aldehído retinal que luego es reducido a retinol. Debido a las dobles ligaduras coordinadas que tienen, los carotenos son excelentes desactivadores del $^1\text{O}_2$, además de que también reaccionan con los radicales peroxilo y el NO_2 , produciendo un radical estable que puede ser reducido con el ascorbato (Hansberg, 2002; Hansberg, 2008).

El glutatión es una molécula importante en la respuesta antioxidante de las células, ya que se encuentra en concentraciones milimolares (Hansberg, 2002). El glutatión (GSH) es un tripéptido no proteico constituido por cisteína, glutamato y glicina, el cual se mantiene en un estado reducido en la célula. El grupo tiol del glutatión es capaz de reducir a otras moléculas inestables como las ERO, o las cisteínas oxidadas de algunas proteínas, además de que protege de oxidaciones irreversibles y/o daño a varios compuestos electrofílicos endógenos y exógenos (Kumar *et al.*, 2011).

Entre los mecanismos enzimáticos de la respuesta antioxidante están las SOD, que dismutan el $\text{O}_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 y O_2 de manera muy eficiente ($10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e independiente del pH (Hansberg, 2002; Hansberg, 2008), mediante la reacción: $2\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. Esta enzima es muy importante en la respuesta antioxidante dado que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ es una de las principales ERO en la célula (Hansberg, 2002). Existen varios tipos de SOD, las cuales son clasificadas dependiendo del metal que tengan en su sitio activo. Las SOD que tienen Cu (II) y Zn (II) suelen localizarse principalmente en el citosol y una pequeña fracción en el espacio inter-membranal de la mitocondria. La SOD1, una SOD con Cu/Zn en su sitio activo, se ha localizado también en el núcleo, los lisosomas y los peroxisomas. En el caso de la SOD3, otra SOD con Cu/Zn, se ha visto que es secretada al espacio extracelular. Las SOD que tienen Mn (III) o Fe (III) suelen estar localizadas en la matriz mitocondrial, aunque también pueden estar presentes en el citosol o en algún orgánulo (Fukai y Usho-Fukai, 2011).

Otro ejemplo de enzimas antioxidantes son las enzimas que degradan el H_2O_2 , las cuales son muy variadas y están representadas ampliamente en todos los organismos. Algunos ejemplos de estas enzimas son las peroxirredoxinas, las cuales son proteínas pequeñas

que se activan a bajas concentraciones de peróxido ($<10 \mu\text{M}$), y lo eliminan mediante la reacción $\text{Cys} (\text{S}^-) + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cys} (\text{SOH}^-) + \text{H}_2\text{O}$. Tienen una cisteína conservada en el sitio activo. Por lo general se encuentran en concentraciones relativamente altas dentro de las células y se pueden encontrar en las mitocondrias, los cloroplastos o ser secretadas. Algunas peroxirredoxinas requieren un donador de electrones externo para funcionar, la mayoría de ellas dependen de la tiorredoxina como donador de electrones, aunque algunas pueden recibir electrones de otros tioles o de otras proteínas específicas que en una parte son semejantes a la tiorredoxina (Hansberg, 2002). Otras enzimas que degradan el H_2O_2 son las peroxidasa, las cuales degradan también otro tipo de peróxidos mediante la reacción: $\text{Donante} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Donante oxidado} + \text{H}_2\text{O}$, donde el donante cambia dependiendo de la peroxidasa, por ejemplo, las peroxidasa del glutatión (GPx), reducen los hidroperóxidos utilizando glutatión como agente reductor. Las peroxidasa de hidroperóxidos de fosfolípidos pueden utilizar tiorredoxina, glutarredoxina o tioles proteicos como fuente de poder reductor. Además hay otras peroxidasa como las ascorbato peroxidasa o la citocromo c peroxidasa de la mitocondria.

Otro ejemplo de proteínas antioxidantes que degradan peróxidos en las células son las catalasas, las cuales son metaloenzimas muy eficientes en la degradación del peróxido intra- y extracelular. Las catalasas se pueden dividir en tres grandes familias debido a su diferente organización oligomérica, estructura y geometría del monómero, además de las diferencias en los residuos del sitio activo. Estas familias son las catalasas de manganeso, las hemo-catalasas bifuncionales y las hemo-catalasas monofuncionales (Klotz *et al.*, 1997; Hansberg *et al.*, 2012; Zámocký *et al.*, 2012).

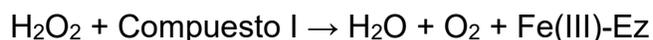
Las ERO se producen en cualquier estado fisiológico, y de manera constante dentro de las células (Konigsberg, 2008). Por lo general, ante una tensión oxidante de baja intensidad, los organismos se suelen adaptar rápidamente y esto hace que una célula pueda resistir luego condiciones más oxidantes (Aguirre *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha observado que en *N. crassa*, que si la tensión oxidativa aumenta dentro de la célula y se da un desbalance severo entre la cantidad de ERO y la respuesta antioxidante, la célula se aísla del O_2 , esto es, se diferencia; si no lo logra, muere (Aguirre *et al.*, 2005). Por

ejemplo, en una mutante de *N. crassa* que carece de la CAT-3 produce mayor cantidad de hifas aéreas, así como un número considerablemente mayor de conidios (Michán *et al.*, 2003), a diferencia de una mutante nula de la NOX, que no produce casi micelio aéreo y la cantidad de conidios que produce es mucho menor a la cepa silvestre (Cano-Dominguez *et al.*, 2008).

Finalmente, las ERO también pueden funcionar como moléculas de señalización celular y son importantes para regular desde la actividad específica de proteínas hasta procesos celulares más complejos (D'Autréaux y Toledano, 2007).

3. Las hemo-catalasas monofuncionales

Las hemo-catalasas monofuncionales son enzimas presentes en la mayoría de los organismos aerobios. Ayudan a eliminar el H₂O₂ descomponiéndolo en O₂ y agua, mediante la reacción que se muestra a continuación:



en donde Fe(III)-Ez representa el grupo hemo que actúa como cofactor de la enzima.

Las hemo-catalasas monofuncionales se clasifican en dos grandes grupos: las de subunidad pequeña (con una masa aproximada de 60 kDa) y las de subunidad grande (con una masa mayor a 80 kDa) que tienen un dominio C-terminal adicional de aproximadamente ≥ 150 aminoácidos (Díaz *et al.*, 2004). Las catalasas de subunidad pequeña se distribuyen ampliamente en todos los organismos, en contraste con las catalasas de subunidad grande que se encuentran solamente en bacterias y en hongos, aunque también se han encontrado en unas pocas arqueas y algunos protistas (Klotz *et al.*, 1997; Zámocký *et al.*, 2012, Hansberg *et al.*, 2012). A diferencia de las catalasas de subunidad pequeña, que se inhiben con el sustrato a concentraciones entre 300 y 500 mM (Chelikani *et al.*, 2004), las de subunidad grande se activan con el H₂O₂ y resisten concentraciones molares (Díaz *et al.*, 2001). Además, se ha observado que las catalasas

de subunidad grande son muy resistentes a la desnaturalización con temperatura o con agentes químicos, así como a la proteólisis. Tienen una alta estabilidad térmica y una mayor actividad enzimática a altas temperaturas (cerca de los 60°C) (Chelikani *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2001).

La secuencia del dominio catalítico de las catalasas de subunidad grande esta muy conservada; no así la secuencia del dominio C-terminal. Como se puede observar en la tabla 1, si no se considera esta región variable tanto el porcentaje de la identidad como la similitud de los aminoácidos en la secuencia de estas proteínas aumenta (Hansberg *et al.*, 2012).

	CAT-3	CAT-1	PVC	HP11
CAT-3	----	45/63	<u>62/78</u>	<u>45/61</u>
CAT-1	49/67	----	<u>39/55</u>	<u>46/60</u>
PVC	<u>70/85</u>	<u>48/65</u>	----	55/69
HP11	<u>54/70</u>	<u>57/70</u>	55/69	----

Tabla 1. Porcentaje de identidad/similitud en la secuencia de cuatro catalasas de subunidad grande, en azul los valores considerando la secuencia total de las catalasas y en verde los valores considerando sólo la secuencia central (482 ± 1 residuos). Se encuentran subrayados los valores con diferencias significativas (7-11%). PVC, catalasa de subunidad grande del hongo *Penicillium vitale*. HP11, catalasa de subunidad grande de *E. coli* (Hansberg, datos no publicados).

4. Las catalasas de subunidad grande de *N. crassa*

N. crassa tiene tres tipos de hemo-catalasas: dos catalasas de subunidad grande, CAT-1 y CAT-3, una catalasa-peroxidasa CAT-2, y una catalasa de subunidad pequeña, CAT-4. El H₂O₂ se elimina principalmente por las catalasas de subunidad grande (Díaz *et al.*, 2009). Los hongos ascomicetos y bacidiomicetos tienen dos catalasas de subunidad grande, los ortólogos de CAT-1 y los ortólogos de CAT-3 (Hansberg *et al.*, 2012).

La CAT-1 y la CAT-3 son proteínas homotetrámicas codificadas por los genes *cat-1* y *cat-3* respectivamente. Para ambas se ha resuelto la estructura cristalográfica. Aunque son muy parecidas, tienen algunas diferencias estructurales que pueden influir en su función (Díaz *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2009; Hansberg *et al.*, 2012; Zárate-Romero *et al.*, 2013). Por ejemplo, en la estructura de la CAT-1 se encontró que tiene un enlace covalente entre el tiol de una cisteína y el residuo de tirosina del sitio activo en el lado proximal del hemo, mientras que la CAT-3 no presenta esta unión covalente ya que la cisteína está sustituida por una glutamina (Díaz *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2009). Por otro lado, la CAT-1 tiene el grupo hemo oxidado, de manera similar a otras catalasas de subunidad grande como la HP11 de *E. coli* y la PVC de *P. vitale*; mientras que la CAT-3 tiene un grupo hemo no oxidado (Díaz *et al.*, 2004, Díaz *et al.*, 2009). Además, en la CAT-1 la salida del oxígeno del sitio activo es a través del canal central hacia la cavidad central; mientras que en la CAT-3 el canal central no es permeable (Díaz *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2009). Tanto la CAT-1 como la CAT-3 son sumamente resistentes a las condiciones desnaturizantes y a concentraciones molares de H₂O₂ (Díaz *et al.*, 2001).

Ambas catalasas presentan una cinética de saturación de dos componentes, uno que se satura a una concentración de H₂O₂ alrededor de 200 mM y otra que se satura a concentraciones molares de sustrato (Lledías *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2009). También se ha observado que tanto la CAT-1 como la CAT-3 se oxidan *in vivo* en presencia del paraquat o ante una tensión calórica (Lledías *et al.*, 1998, Michán *et al.*, 2002).

En cuanto a su localización celular, la CAT-1 está cerca la pared celular del hongo, aunque no cuenta con un péptido de secreción, y se encuentra principalmente en el citoplasma, y tal vez una pequeña cantidad en la mitocondria y en el núcleo (Montes de Oca, 1999). La CAT-3 tiene un péptido señal en el N-terminal para su secreción (Michán *et al.*, 2002) y está glicosilada con N-acetil-glucosamina (Díaz *et al.*, 2001). La CAT-3 se asocia principalmente con la pared celular (Montes de Oca, 1999; Maddi *et al.*, 2009) y se secreta parcialmente, ya que puede ser detectada en el medio de cultivo (Michán *et al.*, 2003).

La expresión de ambas proteínas es diferente durante el ciclo de vida del hongo. La CAT-3 aumenta durante el crecimiento, particularmente en condiciones de estrés, se induce durante la fase de crecimiento pre-estacionario y al inicio del proceso de conidiación (Lledías *et al.*, 1998, Michán *et al.*, 2002), mientras que la CAT-1 se induce en células que no crecen, como por ejemplo, en las hifas de la fase de crecimiento pre-estacionario y principalmente en los conidios. La CAT-3 constituye el 0.6% de la proteína total de los conidios (Michán *et al.*, 2002). Debido a estas diferencias se puede deducir su importancia fisiológica en el hongo, lo cual se corrobora con los fenotipos de las mutantes deficientes de estas catalasas. En el caso de la mutante nula en el gen de catalasa-3, $\Delta cat-3$, presenta un incremento en la tensión oxidante, lo que provoca un aumento en la formación del micelio aéreo y de los conidios en comparación con la cepa silvestre (Michán *et al.*, 2003; Hansberg *et al.*, 2012). Por otro lado, la mutante nula en el gen de catalasa-1, $\Delta cat-1$, afecta la germinación de los conidios.

5. El dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande

El dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande es parecido a la flavodoxina en topología y tiene un alto contenido de estructuras secundarias que interaccionan únicamente con residuos de la misma subunidad (Sevinc *et al.*, 1998). Este dominio consta de láminas beta paralelas unidas por hélices alfa a las que flanquean por ambos lados. Estos elementos están dispuestos en unidades beta-alfa-beta de manera similar al plegamiento Rossmann. Esta estructura está rodeada por varias alfa-hélices que unen el dominio C-terminal al resto de la estructura de la catalasa (Horvath y Grishin, 2001).

El dominio C-terminal de la CAT-1 y CAT-3 son semejantes entre sí en estructura, pero no en secuencia (Figura 2). A pesar de la similitud estructural, los dominios C-terminal de estas catalasas presentan algunas diferencias. Por ejemplo, la secuencia en la CAT-3 es menor (unos 40 aminoácidos) que en la CAT-1 y el extremo final de la CAT-1 es hidrofóbico, en cambio en la CAT-3 tiene un extremo carboxilo hidrofílico orientada hacia la proteína (Díaz *et al.*, 2009).

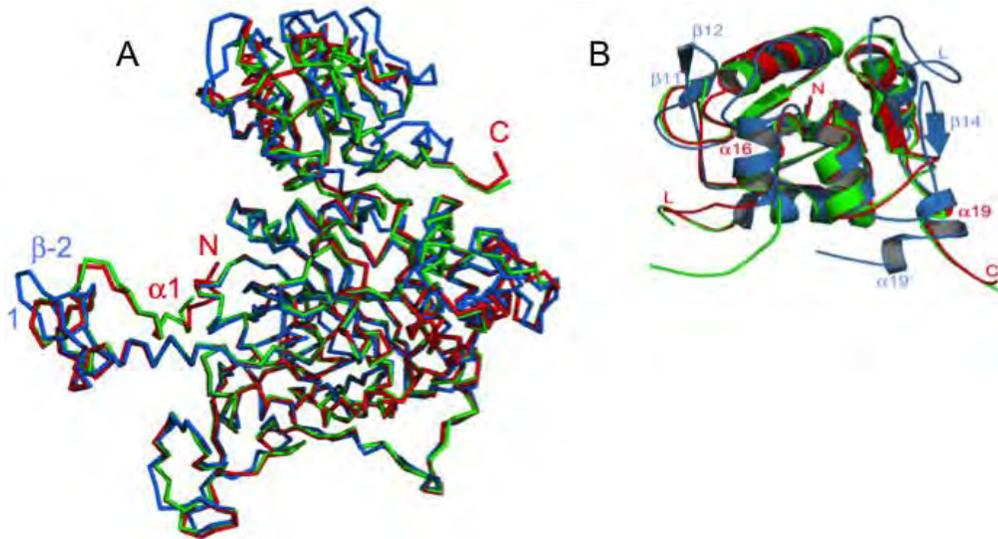


Figura 2. Alineamiento de la estructura de tres diferentes catalasas de subunidad grande. A) Alineamiento de la estructura de los monómeros de la CAT-1 de *N. crassa* en azul, de la CAT-3 de *N. crassa* en rojo y la catalasa PVC de *Penicillium vitale*. B) Alineamiento de la estructura del dominio C-terminal de estas catalasas (tomado de Días *et al.*, 2009).

No se conoce la función de este dominio, sin embargo se ha observado que confiere a la catalasa HP11 de *E. coli* una mayor estabilidad. El dominio C-terminal es indispensable para el plegamiento de la proteína y su estabilidad, ya que mutantes con secciones truncadas del dominio C-terminal de la HP11 presentan plegamientos inadecuados que disminuyen la actividad de catalasa (Sevinc *et al.*, 1998). La pérdida de este dominio debido a la digestión con proteasas provoca la disociación del dímero a 80°C, a diferencia de la proteína completa, que se comienza a disociar a partir de los 95°C, y también pierde su actividad a menores temperaturas (59°C) al contrario de la proteína completa (85°C). Además, el dominio C-terminal da mayor rigidez a la estructura del tetrámero, haciendo que resista más a los cortes proteolíticos (Chelikani *et al.*, 2003). Se ha encontrado una mutante de KatA en *Staphylococcus aureus*, a la cual le falta el dominio C-terminal. Esta mutante presenta agregación de la KatA en condiciones de estrés oxidante lo cual reduce su actividad *in vivo* y la supervivencia de la bacteria en un 60% (Teo *et al.*, 2015).

6. Las superfamilias glutamina-amidotransferasa clase I y DJ-1/ThiJ/Pfpl

El dominio de la HP11 de *E. coli* se ha incluido en la superfamilia de la glutamina-amidotransferasa clase I (GAT I), junto con las proteínas de la familia ThiJ (Horvath y Grishin, 2001). Por otro lado, el dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande es semejante en estructura a la proteína DJ-1 (Hansberg *et al.*, 2012) y también se ha incluido en la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl debido a su semejanza estructural con diferentes proteínas de esta superfamilia (Lucas y Marín, 2007).

Las proteínas de la superfamilia GAT I tiene una estructura tipo flavodoxina, esto es, un plegamiento tipo Rossmann en el dominio conservado ThiJ. Para su actividad de proteasa, ThiJ tiene la triada Cys-His-Glu en medio del dominio tipo flavodoxina. Esta triada, aunque está muy conservada, no se relaciona con la actividad de todas las proteínas de la superfamilia. La triada es similar a la de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl, la cual no es tan conservada, ni tienen una relación evolutiva con GAT I (Tesmer *et al.*, 1996; Massière y Badet-Denisot, 1998). La superfamilia GAT I está compuesta por nueve familias proteicas las cuales son: la familia de las glutamina-amidotransferasas clase I, la de las aspartil dipeptidasas PepE, la del dominio C-terminal de las catalasas, la del dominio A4 de las beta-galactosidasas, la de las proteínas ThuA-like, la del dominio N-terminal de la LD-carboxipeptidasa A, la de las proteínas HTS like, la de las proteínas STM3548-like y la de las DJ-1/Pfpl (Scop.berkeley.edu, 2016). Es importante mencionar que en la familia DJ-1/Pfpl de esta superfamilia están incluidas proteínas que también han sido incluidas en la superfamilia proteica DJ-1/ThiJ/Pfpl.

DJ-1 pertenece a la superfamilia proteica DJ-1/ThiJ/Pfpl, cuyos miembros se encuentran representados en arqueas, en bacterias y en eucariotes (Lucas y Marín, 2007). El árbol filogenético de esta superfamilia incluye proteínas que tienen distintas funciones, como chaperona, catalasa, proteasa, cinasa o factores de transcripción (Lucas y Marín, 2007; Bandyopadhyay y Cookson, 2004; Wei *et al.*, 2007). Todas ellas tienen láminas beta paralelas unidas por hélices alfa, elementos dispuestos en unidades beta-alfa-beta de

manera similar al plegamiento Rossmann, el cual es el dominio conservado ThiJ que está relacionado estructuralmente con el dominio GAT I (Wei *et al.*, 2007).

7. Las chaperonas, sus características y sus funciones.

Las chaperonas moleculares son proteínas que se encargan de asistir al plegamiento *de novo*, prevenir el desdoblamiento y la agregación de las proteínas en la célula, así como de regular la homeostasis de las proteínas celulares (Hartl, 2002; Hartl *et al.*, 2011; Saibil, 2013). Existen diferentes familias de chaperonas que no están relacionadas estructuralmente. Algunos miembros de estas familias son conocidos por formar parte de la respuesta a diferentes tipos de estrés como, por ejemplo, al estrés térmico. Debido a que las chaperonas se inducen en estas condiciones se les nombró Heat-Shock Proteins (que significa proteínas del choque térmico o HSPs). Sin embargo, también se inducen en otras condiciones de estrés en las que hay agregación de proteínas desnaturalizadas y de sus intermediarios (Hartl, 2002; Hartl *et al.*, 2011).

La mayoría de las chaperonas moleculares tienen una baja especificidad por sus sustratos, pero participan en procesos celulares muy específicos (Saibil, 2013). Muchas chaperonas requieren de la unión del ATP y de su hidrólisis para facilitar el doblamiento o desdoblamiento de otras proteínas. Otras tienen un papel protector uniéndose a las zonas hidrofóbicas expuestas, ya sea de las cadenas nacientes de proteínas que se pliegan rápidamente o a los intermediarios parcialmente estructurados. Las chaperonas son necesarias para minimizar la agregación de las proteínas durante su plegamiento y para mantenerlas en solución (Hartl *et al.*, 2011; Saibil, 2013).

Debido a su importancia en el control del plegamiento de las proteínas y en su participación en la respuesta al estrés, se considera que las chaperonas aparecieron temprano en la evolución de las células (Hartl *et al.*, 2011). Se ha considerado que las chaperonas también funcionan evitando la acumulación de plegamientos inestables de las proteínas con mutaciones (Rutherford y Lindquist, 1998).

Dentro de las familias de chaperonas más estudiadas se encuentran los miembros de la familia HSP60, también conocidos como GroEL o chaperoninas; la familia HSP70, llamadas asimismo DnaK; la familia HSP90, conocidos además como HspTG; la familia HSP100, llamadas también ClpA y ClpB; así como las proteínas de choque térmico pequeñas o sHSPs. En la tabla 2 se enlistan las diferentes chaperonas y sus funciones.

Tabla 2. Familias más estudiadas de chaperonas, sus cofactores y sus funciones (modificado de Saibil, 2013).

Chaperonas	Cofactor	Función
Chaperoninas		
HSP60 GroEL (<i>E. coli</i>) CCT (mamíferos) Termosoma (arqueas)	HSP10 GroES	Plegamiento de proteínas, prevención de la agregación de proteínas
Sistema HSP70		
DnaK (<i>E. coli</i>) Ssa, Ssb (<i>S. cerevisiae</i>) BiP (o GRP79) (retículo endoplasmático)	HSP40, DnaJ, Sis1, Hdj1, NEFs, GrpE, HSP110	Desdoblamiento, desagregación, estabilización de las cadenas nascentes; translocación a través de las membranas de los orgánulos; plegamiento; regulación de la respuesta al estrés térmico; marca los sustratos para su degradación.
Sistema HSP90		
HspTG (<i>E. coli</i>) GRP94 (retículo endoplasmático)	HOP, p50, AHA1, p23, FKBP52, UNC45	Unión, estabilización y maduración de receptores esteroides y cinasas; transporte de proteasas; amortiguador de variaciones genéticas; ensamblaje de miosina.
HSP100		
ClpA, ClpB, ClpX, Hsp100 (bacteria, mitocondrias y cloroplastos) p97, RPT1-RPT6 (eucariotes)	Sistema HSP70, ClpP, ClpS	Desdoblamiento, proteólisis, termotolerancia, remodelación de proteínas, solubilización de agregados.
sHSP		
Hsp26 (<i>S. cerevisiae</i>) αB- cristalino (<i>H. sapiens</i>) Hsp16.5 (<i>M. jannaschii</i>) Acr1 (<i>M. tuberculosis</i>)	---	Unión a proteínas parcialmente desnaturalizadas para evitar su agregación irreversible.

8. Las chaperonas de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl

En la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl existen diferentes proteínas con actividad de chaperona. Entre ellas destacan la Hsp31 de *E. coli*, la cual es una proteína homodimérica que fue

identificada originalmente en el análisis del transcriptoma de la bacteria *E. coli* al ser estresada (Richmond, 1999). La Hsp31 tiene actividad de chaperona, evitando la agregación de las proteínas *in vitro* y promoviendo su plegamiento después de su desnaturalización con temperatura o con agentes químicos (Sastry, 2002; Malki *et al.*, 2003). Esta función de chaperona es independiente del ATP, ya que al agregar ATP su actividad se reduce, pues compite con las proteínas parcialmente desnaturalizadas por la unión a los parches hidrofóbicos (Sastry *et al.*, 2002). El mecanismo de acción de esta chaperona consiste en la unión de las zonas hidrofóbicas expuestas de los intermediarios de las proteínas parcialmente desdoblados con una zona hidrofóbica presente en la superficie del dímero de Hsp31 y cercana a la interface del mismo. Para su acción requiere un asa flexible que une ambas áreas hidrofóbicas de los monómeros. Cuando se muta el asa se reduce o elimina la actividad de chaperona (Sastry *et al.*, 2004).

DJ-1 de *H. sapiens* presenta actividad de chaperona evitando la agregación de las proteínas *in vitro*. La actividad de chaperona de esta proteína está relacionada a su estado redox, ya que depende de la cisteína conservada en su sitio activo. Cuando la cisteína está oxidada, se reduce significativamente su actividad de chaperona (Shendelman *et al.*, 2004). En la DJ-1 también se ha identificado una zona hidrofóbica en la superficie de la proteína, la cual se sugiere presenta la misma función que en la Hsp31 (Lee *et al.*, 2003). Tanto DJ-1 como Hsp31 tienen también actividad de glioxalasa III, es decir, que reparan los residuos de cisteína, arginina y lisina que han sido modificados con metilglioxal o con glioxal (Richarme *et al.*, 2014; Mihoub *et al.*, 2015). La función de glioxalasa III es muy importante en estas proteínas, ya que por ejemplo en el caso de Hsp31 (YDR533cp) de *S. cerevisiae*, la actividad de glioxalasa III es importante en el mantenimiento de la homeostasis redox, debido a ser una glioxalasa independiente de glutatión, lo que le permite contener el daño a proteínas glicadas durante el estrés oxidativo (entre las cuales se encuentran proteínas como las catalasas, las glutatión peroxidasas y las glutatión reductasas), donde los niveles de glutatión reducido bajan, impidiendo la actividad de las glioxalasas I y II las cuales son dependientes de esta molécula (Bankapalli *et al.*, 2015).

Antecedentes

1. La actividad de la CAT-1 a altas temperaturas

La CAT-1 se aisló a partir de los conidios de *N. crassa* y se observó que su temperatura óptima para su actividad es de 55°C. La actividad disminuye poco al incrementar la temperatura, de tal manera que a 75°C la actividad específica de la enzima es la misma que a 20°C (Figura 1) (Díaz y Hansberg, datos no publicados).

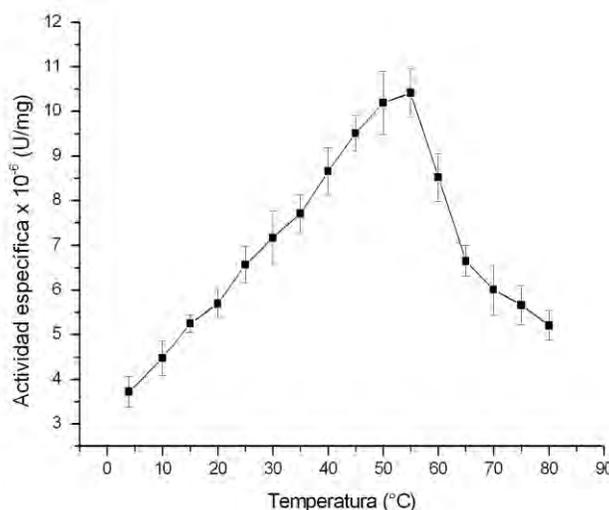


Figura 3. Temperatura óptima de la actividad de la CAT-1. Actividad específica de la CAT-1 después de ser incubada por una hora a diferentes temperaturas. La actividad de la enzima se determinó midiendo la producción de oxígeno a 25°C.

La pérdida de la actividad de la enzima depende de la disociación del dímero en monómero, el cual no tiene actividad de catalasa. En la figura 2 se muestra un gel de electroforesis SDS-PAGE y un zimograma con la enzima incubada durante 24 h a diferentes temperaturas en un intervalo de 30 a 90°C. Con la temperatura de incubación el dímero de la enzima se va disociando, con lo cual disminuye la actividad de catalasa (Díaz y Hansberg, datos no publicados).

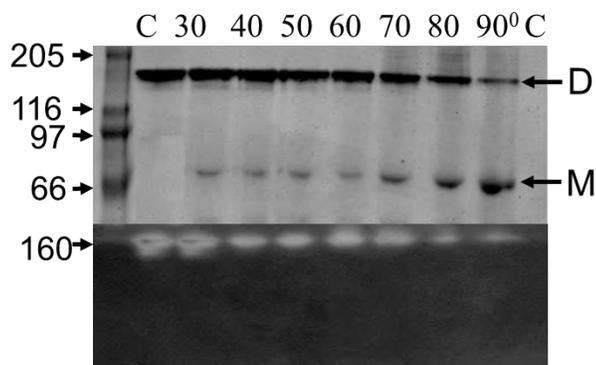


Figura 4. Pérdida de la actividad de la CAT-1 debida a la disociación del dímero con la temperatura. Arriba se muestra un SDS-PAGE (acrilamida al 8%) de la CAT-1 teñido con azul de Coomassie después de ser incubada a diferentes temperaturas por 24 horas. Abajo se muestra la actividad de catalasa en el gel con 10 μ g de enzima después de la incubación a diferentes temperaturas. M, monómero; D, dímero.

2. La CAT-1 sin el dominio C-terminal

La CAT-1 tiene dos sitios de corte para la proteasa subtilisina. Así, al digerir con esta proteasa, la enzima pierde el dominio carboxilo terminal completo y 14 aminoácidos del amino terminal, sin que pierda su actividad. El monómero de la CAT-1 procesada tiene una masa de 63 kDa, por lo cual la denominamos C63 (Figura 3) (Rangel y Hansberg, datos no publicados).

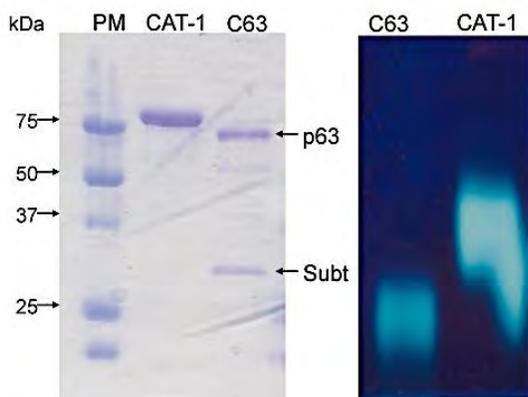


Figura 5. La CAT-1 y la enzima C63 resultante de la digestión con subtilisina- A la izquierda se muestra un SDS-PAGE (acrilamida al 8%) con la CAT-1 y la C63 (correspondiente a la CAT-1 sin el dominio C-terminal y 14 aminoácidos del N-terminal).

A la derecha se muestra la actividad de catalasa en el gel de poliacrilamida (acrilamida 8%). Subt, Subtilisina; p63, monómero de enzima C63.

3. La estabilidad de la CAT-1 en diferentes condiciones

La CAT-1 aumenta su actividad al ser expuesta a altas temperaturas (Figura 1) y también a concentraciones altas de sales, o de cloruro de guanidina (Díaz *et al.*, 2009). Esto se explica a que la estructura de la CAT-1 es muy rígida y, al añadir diferentes agentes desnaturizantes, la estructura se flexibiliza permitiendo una mayor entrada de sustrato al sitio activo de la catalasa. En la figura 4 se muestra que distintos detergentes también aumentan la actividad de la CAT-1 (Rangel y Hansberg, datos no publicados). Sin embargo, la enzima C63 (correspondiente a la CAT-1 sin el C-terminal y 14 aminoácidos del amino terminal) no presenta un aumento de la actividad (Figura 4 A, B, C). Es importante hacer notar que la actividad de ambas proteínas se mantiene a concentraciones de 10% de SDS, o de Tritón X100, o de CTAB. En la figura 4 D se muestra la desnaturización de la CAT-1 al ser incubada a 93°C dando una vida media de 72 min; en cambio la C63 es menos termo-resistente y su vida media a 93°C se reduce a 18 min (Rangel y Hansberg, datos no publicados).

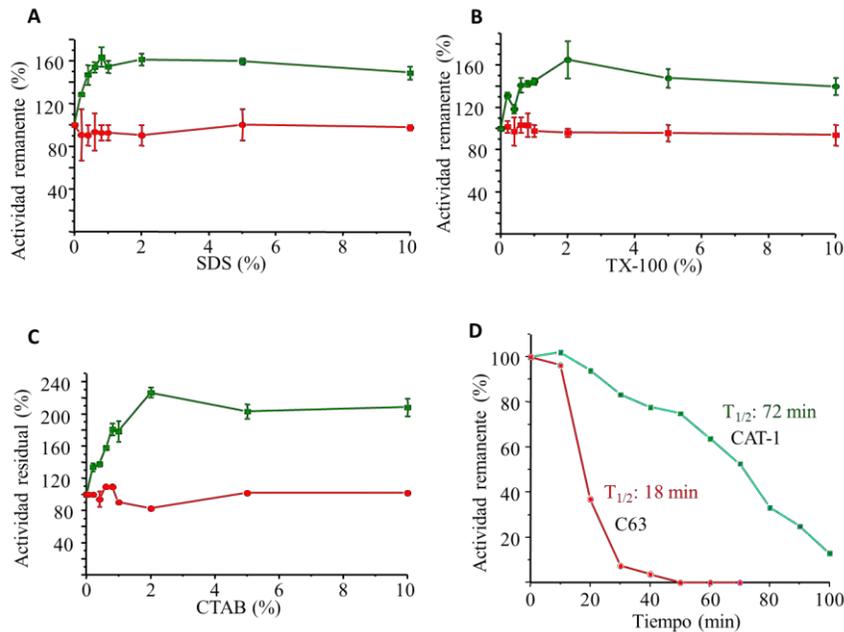


Figura 6. Actividad de la CAT-1 (líneas verdes) y de la enzima sin el C-terminal, C63 (líneas rojas), incubadas con diferentes detergentes o a 93°C. Incubadas durante 72 h en presencia del (A) detergente aniónico SDS, (B) detergente no iónico TX-100 o (C) del detergente catiónico CTAB. La actividad se determinó midiendo la liberación de O₂ a 25°C. D) Pérdida de la actividad de la CAT-1 y de la C63 incubada a 93°C.

4. Ensayo de chaperona con la citrato sintasa

En vista de que la termo-estabilidad de la CAT-1 se pierde cuando se elimina el dominio C-terminal (Figura 6 D), es posible que este dominio funcione como chaperona de la propia enzima. Para definir si el dominio C-terminal funciona como chaperona también con otras proteínas, se utilizó la desnaturalización con calor de la citrato sintasa (CS). El ensayo mide la desnaturalización de la CS por los cambios en la dispersión de luz al ser incubada a 42°C. La desnaturalización de la CS disminuye con la presencia de la CAT-1 en relación directa con su concentración; por el contrario, la C63, que carece del dominio C-terminal, no presenta este efecto (Figura 7) (Rangel y Hansberg, datos no publicados). Debido a lo anterior, pensamos que el dominio C-terminal de las catalasas de subunidad

grande puede funcionar como chaperona, evitando que otras proteínas se desnaturalicen en condiciones de estrés.

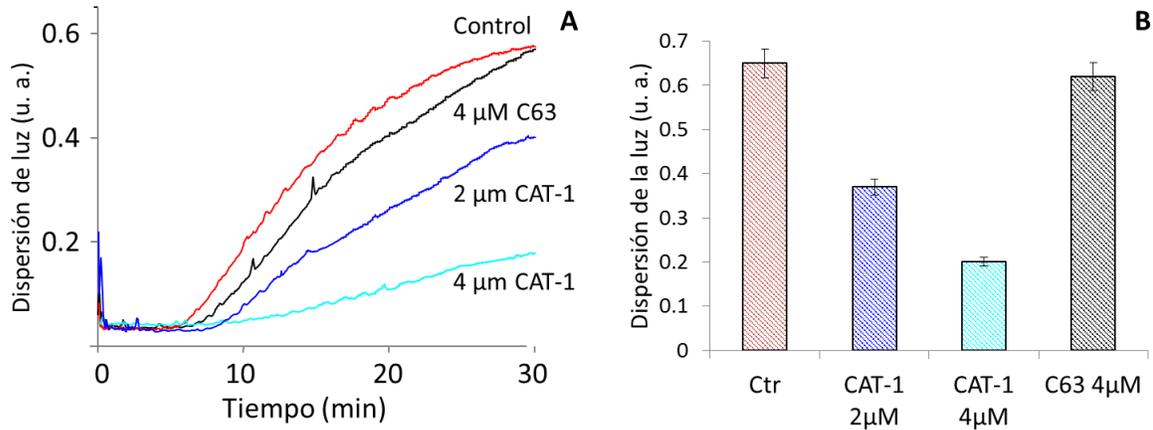


Figura 7. Protección contra la desnaturalización con calor de la CS en presencia de la CAT-1 o de la C63. Se observa la dispersión de la luz generada por el desdoblamiento de la CS a 42°C en presencia de 4 μM de albumina (control en rojo). A) Protección de la desnaturalización de la CS (4 μM) en relación directa con la concentración de la CAT-1 (2 y 4 μM) (azul oscuro y claro) y ausencia de dicho efecto con la C63 (la CAT-1 sin el dominio C-terminal) (negro). B) Cuantificación del efecto de la CAT-1, promedio de tres experimentos después de 30 min de incubación.

Hipótesis

Las catalasas de subunidad grande tienen dos dominios, uno enzimático y otro que tiene actividad de chaperona. El dominio C-terminal da estabilidad a la enzima y evita la desnaturalización de otras proteínas en condiciones de estrés.

Objetivo general

Determinar si el dominio carboxilo terminal de las catalasas de subunidad grande de *N. crassa* tiene actividad de chaperona.

Objetivo particulares

- a) Determinar la semejanza estructural del dominio C-terminal con las proteínas de las superfamilias GAT I y DJ-1/ThiJ/PfpI
- b) Expresar y purificar la CAT-3 recombinante, así como purificar el dímero del dominio C-terminal de esta a partir de la digestión de la proteína con la proteasa trombina.
- c) Purificar la CAT-1 a partir de conidios de *N. crassa* y aislar la proteína sin el dominio C-terminal mediante la digestión de la enzima con la proteasa subtilisina.
- d) Probar la actividad de chaperona de la CAT-1 y de la CAT-3 usando diferentes enzimas.

Metodología

1. Cepas de *Escherichia coli*

Para el presente trabajo se emplearon dos cepas de *E. coli* para la preservación y para la expresión heteróloga de la proteína. A continuación describimos cada cepa usada:

Los plásmidos usados en este trabajo fueron conservados transformándolos en la cepa XL1 blue, la cual tiene un genotipo *endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)*. Se empleó esta cepa debido a que carece de la endonucleasa A, lo que permite que los plásmidos insertados no sean degradados con el tiempo; la mutación *hsdR* impide la escisión del ADN clonado por el sistema de endonucleasa EcoK y además esta cepa es deficiente de la recombinasa *recA*, lo que mejora la estabilidad de la inserción de los plásmidos con un gen de otra especie.

El plásmido fue transformado en la cepa de *E.coli* UM2, la cual tiene un genotipo F-, *araC14, leuB6(Am), secA206(aziR), fhuA23, lacY1, proC83, tsx-67, purE42, glnV44(AS), galK2(Oc), LAM-, trpE38, xthA15, his-208, rfbC1, mgl-51, argG77, rpsL109(strR), glpR201, xylA5, mtl-1, ilvA681, thi-1, metA160, katG15, katE2*; y carece de los genes para catalasa.

2. Plásmidos

El gen de la catalasa-3 de *N. crassa* fue subclonado del plásmido pSM3, en el cual se clonó a partir de su cDNA (Michán *et al.*, 2003), al plásmido pCold I (Zárate-Romero *et al.*, 2013). El plásmido pCold I (4.4 kpb, Takara) es un plásmido con un sistema de sobre-expresión heteróloga que tiene el promotor derivado del gen *cspA*, él cual es inducible a bajas temperaturas (cold-shock). Esto favorece la expresión de la proteína heteróloga mientras que disminuye la expresión endógena. Rio abajo del promotor se encuentra un operador derivado del gen *lac* de *E. coli*, así como la secuencia TEE (translation enhancing element) del gen *cspA*. Además tiene una secuencia que codifica para una

etiqueta de seis histidinas en el amino-terminal para la purificación de la proteína y para la secuencia de corte para la proteasa Factor Xa, río abajo de la etiqueta de histidinas.

3. Condiciones de crecimiento y almacenamiento de *E. coli*

Para el crecimiento de las bacterias *E. coli* en medio líquido se usó el medio Luria Broth Lennox (LB, Sigma Aldrich L3022) al 2% y para el medio sólido en placa se empleó el mismo medio con agar al 2% en cajas Petri de 15 cm de diámetro. Los cultivos se incubaron a 37°C y, en el caso de cultivo líquido, con agitación a 200 rpm. Se empleó ampicilina (Sigma Aldrich A0166) a una concentración de 100 mg/ml como medio de selección. Para preservar las cepas se empleó 200 µl de glicerol al 100% estéril, con 800 µl de cultivo líquido crecido a 37°C con 200 rpm por 12 horas y guardados a -80°C.

4. Preparación de las cepas bacterianas competentes

Se empleó el método de Inoue *et al.*, 1990 para la preparación de células competentes. Las bacterias se estriaron en placas de LB-agar para aislar colonias y se incubaron a 37°C toda la noche. Se picó una colonia con un palillo estéril y con ella se inoculó 250 ml de medio SOB (extracto de levadura 0.5%, peptona 2%, 10 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄) en un matraz de 2 l. Se hicieron crecer a 18°C, con agitación de 200 rpm, hasta alcanzar una absorbencia a 600 nm de 0.6. El matraz se puso en hielo por 10 min y se centrifugó el cultivo a 4600 rpm por 10 min a 4°C. La pastilla se lavó suavemente suspendiéndola en 80 ml de solución TB (10mM de Pipes, 15 mM CaCl₂, 250 mM de KCl, 55 mM de MnCl₂, pH 6.7, ajustada con KOH y esterilizado por filtración) fría, procurando mantener las bacterias en frío y tratándolas con suavidad. Después se dejaron en un baño de hielo por 10 min, se volvieron a centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos, a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se suspendió la pastilla en 10 ml de TB y luego se le añadió 700 µl de DMSO estéril y se mezcló. Se hicieron alícuotas del cultivo que se guardaron a -80°C.

5. Transformación de las cepas bacterianas con un plásmido

Para la transformación de las cepas bacterianas se empleó un protocolo de transformación por choque de calor. Se descongeló en hielo una alícuota de las células

competentes a la que se le añadió 1 a 5 μ l de ADN plasmídico por cada 100 μ l de células, se mezcló suavemente con la micropipeta y se dejó en hielo por 30 min. A continuación, se le dio el choque de calor a 42°C por 1 min y luego se dejó reposar en hielo por 5 min. Se añadió a las células 500 μ l de medio nutritivo SOC (extracto de levadura 0.5%, peptona 2%, 10 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄, 20 mM de glucosa) y se incubaron a 37°C, a 200 rpm, por una hora.

Las células fueron plaqueadas en cajas Petri de 15 cm con medio sólido LB-agar al 2% con 100 mg/ml de ampicilina como medio de selección. Se incubaron a 37°C por 12 horas para obtener colonias. De una colonia se aisló el DNA para determinar su patrón de digestión con enzimas de restricción o para su amplificación por PCR.

6. La cepa de *N. crassa*

Para la purificación de la proteína CAT-1 se empleó la cepa silvestre 74-OR231A obtenida del “Fungal Genetics Stock Centre” (FGSC), del linaje ST. Lawrence (Oak Ridge, Cal. E. U.).

7. Condiciones de crecimiento para *N. crassa*

N. crassa se hizo crecer en medio mínimo Vogel-sacarosa (VS), el cual contiene 1.5% de sacarosa como fuente de carbono, 2% de sales de Vogel (Davis y De Serres, 1970) y 2% de agar en el caso del medio sólido, en matraces de 500 ml, manteniendo siempre una proporción de 5:1 aire/medio y una temperatura de incubación de 30°C.

8. Obtención de conidios de *N. crassa*

Se inoculó el medio sólido VS-agar con 1×10^6 conidios y se hicieron crecer a 30°C en la oscuridad por 3 días y posteriormente en la luz a 25°C por dos días. Los conidios se colectaron en 50 ml agua fría y estéril, agitando vigorosamente para permitir el desprendimiento de todos los conidios. Se alícuota la suspensión de conidios en tubos Eppendorf de 1.5 ml que se almacenaron a -80°C.

9. Expresión de la CAT-3 en *E. coli*

Para la expresión de la enzima, se hizo crecer un cultivo a partir de una colonia de la cepa en medio LB Lennox con 100 mg/ml de ampicilina, incubada a 37°C, con agitación a 200 rpm, toda la noche. Con 1 ml de cultivo se inocularon 100 ml de medio y se incubó a 37°C, con agitación de 200 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.4. Al cultivo se le añadió IPTG (Promega V3955), a una concentración final de 1 mM y de 30 mM de hemina, pH 9.6 (Frontier Scientific H651-9) y se incubó a 16°C, con agitación de 200 rpm, por 48 h.

10. Extracción y purificación de la CAT-3

La proteína se extrajo y se purificó según el manual de QIAGEN de expresión de proteínas con etiqueta 6xHis (5° edición). El cultivo se centrifugó 15 min a 5,500 rpm y la pastilla se suspendió en solución de lisis en condiciones no desnaturalizantes (NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, imidazol 10 mM, pH 7.0 ajustado con NaOH) en relación de 1 l de cultivo por 10 ml de solución, añadiendo un coctel de proteasas a una concentración 1x (Sigma Aldrich S8830). Las células se rompieron empleando lisozima 100 mg/ml (Sigma Aldrich L-6876) a una concentración final de 1 mg/ml y se incubaron a 4°C durante 1 h y posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido y se descongelaron a 42°C, lo cual se realizó tres veces. A las células desintegradas se les agregó DNAsa (Sigma Aldrich 10104159001) y RNAsa (Sigma Aldrich R4875) a 10 mg/ml a una concentración final de 1.5 mg/ml y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente se separaron las membranas centrifugado a 13,000 rpm durante 30 min.

El extracto celular se incubó durante una hora con la resina Ni-agarosa (QIAGEN 30250) previamente equilibrada con solución de lisis. La resina une la proteína etiquetada en una proporción de 4 mg/ml. Se dejó asentar la resina en una columna de vidrio de un centímetro de diámetro y se pasaron 5 volúmenes de solución de lisis y 10 volúmenes de solución de lavado (NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, imidazol 20 mM, pH 7.0, ajustado con NaOH). Para desprender la CAT-3 de la columna se pasaron tres volúmenes de solución de elusión (NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, imidazol 250 mM, pH 7.0, ajustado con NaOH). Las fracciones con mayor actividad de catalasa se concentraron usando un

filtro Amicon de 30,000 Da. La purificación de la proteína se comprobó por electroforesis en un gel de poliacrilamida (8% de acrilamida) y se tiñó con azul de Coomasie (véase más adelante). La CAT-3 purificada se guardó a 4°C en presencia de inhibidores de proteasas (coctel de proteasas Sigma- Aldrich S8820)

11. Digestión de la CAT-3 con la proteasa trombina

La CAT-3 tiene tres sitios de corte de la proteasa trombina: después de las argininas 74, 238 y 453. Con la trombina se elimina el dominio catalítico y permite el aislamiento del dímero del dominio C-terminal. La digestión de la proteína da una proteína de 50 kDa, la cual denominamos C50 y corresponde al dímero del dominio C-terminal.

Se utilizó trombina unida a perlas de agarosa (Sigma Aldrich RECOMT). Con 200 µl de las perlas de agarosa trombina en solución se puede digerir >85% de 1 mg de proteína en cuatro horas a temperatura ambiente. Para eliminar los inhibidores de proteasas de la CAT-3 se usó un filtro Amicon de 30,000 Da y amortiguador Tris 50 mM, pH 8.0. Las perlas con trombina, se lavaron dos veces con 1 ml de la solución de corte 1x (Tris 50 mM, pH 8.0, CaCl₂ 10 mM) para eliminar el etanol. Se les agregó 100 µl de solución de corte 10x y 1 mg de CAT-3. El volumen se ajustó a 1 ml para tener una concentración final de la solución de corte de 1x. Posteriormente se incubó a 37°C por 24 h con agitación moderada a 70 rpm. La digestión de la proteína se comprobó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida (12% de acrilamida) y la proteína en el gel se tiñó con azul de Coomasie (véase más adelante).

12. Purificación de la CAT-1

Se purificó la CAT-1 a partir de los conidios de *N. crassa* según el método descrito en Díaz *et al.*, 2001. Se recolectaron los conidios del hongo agregando acetona fría al cultivo sólido agitando vigorosamente para permitir el desprendimiento de la mayor cantidad de conidios. Los conidios se recuperaron filtrando con vacío la acetona en un Büchner de porcelana con filtro de papel Whatman no. 4 y luego se secaron por evaporación a temperatura ambiente en cajas Petri de vidrio por media hora. Los polvo de acetona se homogeneizaron en una licuadora con perlas de vidrio usando 40 ml de solución H

(boratos 10 mM, KCl 10 mM, manitol 20 mM, lauril sulfato sodico 2%, PMSF 0.5 mM, EDTA 1 mM, DTT 0.2 mM, ácido acetilsalicílico 1 mM, pH 6.8) por cada 2 g de polvos de acetona. El extracto celular se centrifugó a 6000 rpm por 7 min, recuperando el sobrenadante. Esto se repitió tres veces, suspendiendo y homogeneizando la pastilla con la solución I (boratos 10 mM, KCl 10 mM, manitol 20 mM, PMSF 0.5 mM, EDTA 1 mM, DTT 0.2 mM, pH 8.0).

Los tres sobrenadantes se unieron y se congelaron con nitrógeno líquido y luego se descongelaron a 42°C. Este procedimiento se repitió para eliminar el detergente. Después se centrifugó a 6000 rpm por 7 min y el sobrenadante se precipitó con dos volúmenes de acetona a -20°C durante 12 h. Posteriormente se volvió a centrifugar a 6000 rpm por 10 min, se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente por 30 min. La pastilla se suspendió en 8.5 ml de solución J (boratos 10 mM, KCl 10 mM, manitol 20 mM, PMSF 0.5 mM, pH 8.0) y se volvió a centrifugar a 6000 rpm por 7 min, se aisló el sobrenadante y se repitió este paso dos veces más. Los tres sobrenadantes se mezclaron y, considerando el volumen total, se precipitaron las proteínas con 20% de sulfato de amonio, añadiéndolo poco a poco y manteniendo el sobrenadante en frío con agitación mediante una varilla magnética. La solución se agitó por una hora y después se centrifugó a 6000 rpm por 10 min y se guardó el sobrenadante. A continuación, el sobrenadante se llevó a una concentración de 35% de sulfato de amonio (considerando que la concentración de la solución es de 20%) y se dejó precipitar como en el paso anterior. Después se centrifugó a 6000 rpm por 10 min y la pastilla se suspendió en 2 ml de amortiguador de fosfatos Na/K 50 mM, pH 7.8, con 0.5 mM de sulfato de amonio.

La CAT-1 obtenida se pasó por una resina de Fenil-Sefarosa CL-4B. Se emplearon 5 ml de resina, lavada con 10 ml de agua destilada y equilibrada con amortiguador de fosfatos 50 mM Na/K, pH 7.8, con 0.5 mM de sulfato de amonio. A la resina se le añadió la proteína y se dejó agitando por 30 min a 4°C. Después se lavó con 30 ml de la misma solución amortiguadora y un segundo lavado con 20 ml, para eluir la enzima con 20 ml de solución de fosfatos Na/K 10 mM, pH 7.8. Las fracciones con mayor actividad de catalasa se concentraron en un volumen final de 1 ml con un filtro Amicon de 30,000 Da. La purificación de la proteína se verificó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida

(acrilamida al 8%), a 150 V por 1.5 horas. El gel se tiñó con azul de Coomasie y también para actividad de catalasa (véase más adelante).

13. Digestión de CAT-1 con la proteasa subtilisina

La CAT-1 se trató con subtilisina, a una relación de 7:1 de proteasa/enzima, y se incubó a 30°C por 30 min. El resultado de la digestión es un péptido denominado C63 de 63 kDa que es la CAT-1 sin el dominio C-terminal ni 14 aminoácidos del N-terminal. El péptido se comprobó por electroforesis en gel de poliacrilamida (acrilamida al 8%), se tiñó con azul de Coomasie y también se vió su actividad en un zimograma (véase más adelante).

14. Electroforesis de proteínas

Los extractos de proteína se analizaron en geles de poliacrilamida al 8%, 10% o 12%, de 1 mm de grosor, en condiciones desnaturizantes, siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970). A las muestras se les añadió el volumen necesario de solución de carga 5x (50% glicerol, 0.125 M Trizma/HCl, pH 6.8, 1% SDS, 10% β -mercaptoetanol, 0.02% de azul de bromofenol) para obtener una concentración final al 1x. La electroforesis se corrió en una cámara Mini protean III (Bio- rad) con solución de corrida desnaturizante (1.44% glicina, 0.3% Trizma base, 0.01% SDS, pH 7.0). Primero se dejó correr a 70 V durante 20 min y posteriormente a 150 V por una hora o hasta que el frente de corrida llegara al borde del gel. Para la tinción con azul de Coomasie se fijó en una solución de 30% metanol y 10% ácido acético por 10 minutos con agitación moderada. Posteriormente se tiñó la proteína poniendo el gel en una solución de azul de Coomasie (240 mg de azul de Coomasie en 120 ml de etanol y 40 ml de ácido acético, ajustando con agua destilada a 500 ml) y se destiñó el gel con solución para desteñir (40% metanol, 20 % ácido acético glacial en agua).

15. Zimograma de actividad de catalasa

Para detectar la actividad de catalasa en el gel de poliacrilamida se corrió la electroforesis en condiciones no desnaturizantes en amortiguador de corrida no desnaturizante (glicina 1.44%, Trizma base 0.3%, pH 7.0), durante 2 h a 150 V.

El gel se sumergió en una solución de metanol al 5% durante dos minutos, se enjuagó con agua destilada y luego se incubó en una solución de H₂O₂ al 0.03% durante 5 min, en agitación moderada. Después de enjuagar el gel con agua destilada, se dejó agitando en una solución de ácido acético al 10% por un minuto para detener la reacción de la catalasa y se volvió a enjuagar con agua. La actividad se reveló incubando el gel en una solución de ferricianida de potasio y cloruro férrico (0.3 g en 15 ml de agua para cada reactivo, que se agregan al mismo tiempo) hasta que el gel se tiña de azul debido a la precipitación de las sales con el H₂O₂. En los sitios en donde la actividad de catalasa eliminó el H₂O₂ no se forma el precipitado.

16. Ensayos de chaperona

El ensayo de chaperona se basa en la inhibición del proceso de desnaturalización de una proteína mediante técnicas de espectroscopía. Para el presente trabajo empleamos la desnaturalización de la CS y de la alcohol deshidrogenasa (ADH) con temperatura y de la β-galactosidasa (β-gal) con urea.

16.1 Ensayo de chaperona usando la citrato sintasa

Usamos el ensayo de chaperona descrito por Buchner *et al.*, 1998. Se empleó la CS de corazón de porcino (Sigma Aldrich C-3269) y se midió la dispersión de luz de la muestra con un fluorómetro SLM Aminco (600 V, ganancia 10, 500 nm excitación-emisión). Se empleó una concentración de 4 μM de CS como dímero y una concentración del tetrámero de las catalasas de 2 o 4 μM, llevando a un volumen final de 500 μL con amortiguador de fosfatos Na/K a 50 mM, pH 7.8. La medición se realizó por 30 min registrando a cada dos segundos, a una temperatura de 42°C, sin agitación, en celdas de vidrio de 500 μl. En el control se usó albumina a 4 μM.

16.2 Ensayo de chaperona usando alcohol deshidrogenasa

Para la ADH se empleó el ensayo de chaperona de Horwitz, 1992. Se usó la ADH comercial de *S. cerevisiae* (Sigma Aldrich 9031-72-5) a una concentración de 6.2 μM como tetrámero, en amortiguador de fosfatos a pH 7.0, midiendo la dispersión de luz en un espectrofotómetro Beckman DU650 a 360 nm, a 45°C, durante 150 min, tomando

lectura cada 20 s. Al control se le añadió albumina (6.2 μM). La CAT-1 y la CAT-3 se usaron a concentraciones de 1 o 3 μM , calculando su concentración como tetrámeros. Las muestras se mezclaron a temperatura ambiente en celdas de cuarzo de 500 μl y se llevaron a un volumen final de 400 μl .

16.3 Ensayo de chaperona usando β -galactosidasa

El ensayo de chaperona para β -gal fue descrito por Ayling y Baneyx, 1996. Se usó β -gal comercial de *E. coli* (Sigma Aldrich G3153). Para medir la dispersión de luz de la muestra se empleó un fluorómetro SLM Aminco (600 V, ganancia 10, 500 nm excitación-emisión) y se incubó la β -gal en una solución de urea 8 M, en Tris 100 mM, pH 8.0, durante 30 min. La albumina, la CAT-1 o la CAT-3 se mezclaron con la β -gal a temperatura ambiente antes de la incubación con urea. La muestra se diluyó 30 veces con Tris 100 mM, pH 8.0, para lograr una concentración final de 0.5 μM de β -gal e inmediatamente se leyó la dispersión de la luz durante 600 s en el fluorómetro, a temperatura ambiente.

17. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos y de las estructuras

Se realizó un alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal de 64 catalasas de subunidad grande ortólogas de las de *N. crassa*, para ello se obtuvieron as secuencias de aminoácidos de la base de datos NCBI y se empleó el programa ClustalW para realizar el alineamiento.

A partir de la estructura cristalográfica de la CAT-1 y de la CAT-3, obtenidas del Protein Data Bank (PDB), se seleccionó el dominio C-terminal de cada una y se realizó un alineamiento estructural comparándolas con todas las proteínas del PDB, empleando para ello el servidor DALI v.3 (Holm, y Rosenstrom, 2010). De la lista de proteínas más parecidas en estructura se seleccionaron otras dos catalasas y 16 proteínas más de la superfamilia GAT I o de la DJ-1/ThiJ/Pfpl. En ambos casos se incluyeron proteínas representativas de la diversidad funcional de las superfamilias. Con el archivo PDB de las 20 proteínas se hizo un alineamiento múltiple usando para ello el servidor POSA v.1 (Li *et al.*, 2014), con el cual se obtuvo un valor de RMSD (por sus siglas en inglés: Root-Mean-Square Deviation), que es la distancia media en Å entre los átomos de las proteínas superpuestas. Este valor de RMSD es aparente, ya que se emplearon estructuras

cristalográficas con diferente grado de resolución (en el caso de la superfamilia GAT I, entre 1.7 y 2.8 Å; en la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl, entre 1.05 y 2.3 Å). A partir de estos valores se construyó la matriz de distancias y el fenograma, empleando para ello el programa D-UPGMA (Garcia-Vallve *et al.*, 1999).

Se empleó el servidor POSA para realizar el alineamiento estructural de las proteínas, del cual se obtuvo un archivo PDB y se obtuvieron las imágenes con el programa PyMOL v1.7.4.4. El alineamiento de las 20 secuencias fue hecho con el programa ClustalW2 y se obtuvo el valor de conservación con el servidor PRALINE.

18. Análisis de las zonas hidrofóbicas de la superficie de las proteínas

Se obtuvieron las estructuras cristalográficas de las diferentes proteínas del PDB. Se colorearon los aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas en amarillo (Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Met, Trp, Tyr, Cys), los aminoácidos cargados positivamente en azul (Arg, Lys), los cargados negativamente en rojo (Glu, Asp) y los demás aminoácidos se colorearon en gris. Posteriormente se analizó la superficie y se buscaron las zonas hidrofóbicas. Para las zonas hidrofóbicas en la Hsp31 de *E. coli* y la DJ-1 humana se tomaron en cuenta los datos de la literatura.

Resultados

1. El dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande tiene algunos aminoácidos conservados

Para determinar si la secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande esta conservada, se hizo un alineamiento con 64 proteínas ortólogas de las catalasas de subunidad grande de *N. crassa*. Los alineamientos en la literatura sólo incluyen el dominio catalítico, está muy conservado, y no incluyen la secuencia del dominio C-terminal debido a su disparidad. A partir de este alineamiento se determinó que el dominio C-terminal tiene 45 aminoácidos conservados (Figura 8), 14 de los cuales se encuentran en la superficie de la proteína, 27 en la región interna y 4 en el túnel de agua, el cual corresponde a la intercara entre los monómeros del dominio C-terminal en el dímero (Figura 9).

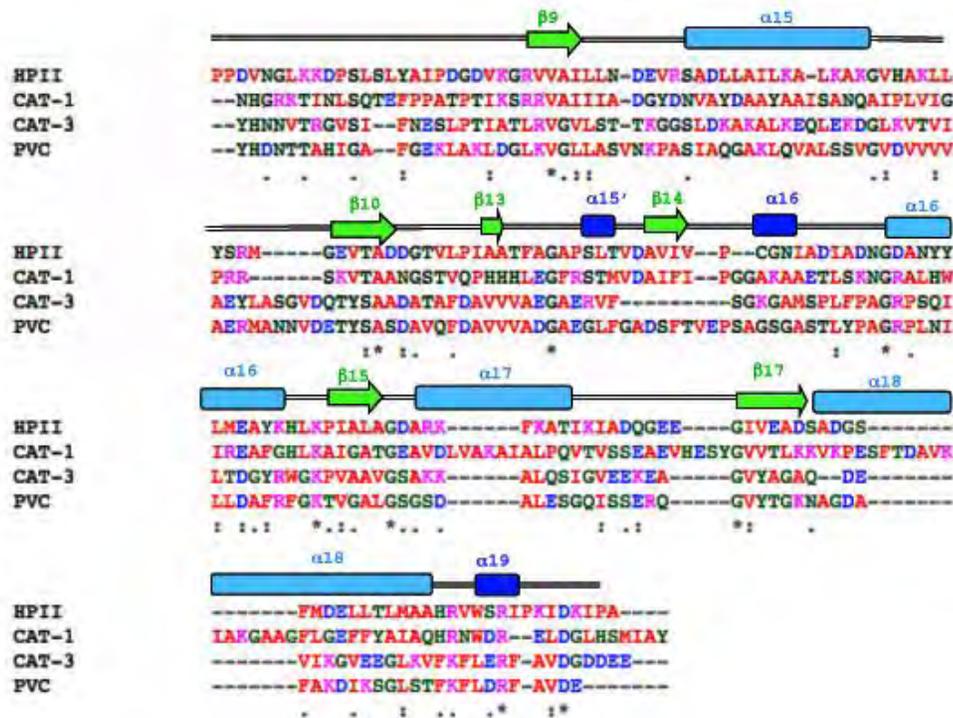


Figura 8. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal de cuatro catalasas de subunidad grande. Los aminoácidos idénticos está marcados con

asterisco (*) y los aminoácidos que se parecen en características (:) y otros que se parecen, pero menos (.).

En la figura 9 se observa la región donde se localizan los aminoácidos conservados, marcados en la estructura del dominio C-terminal de la CAT-3. Los aminoácidos conservados forman parte de las láminas beta paralelas y algunas alfa- hélices circundantes. La región conservada corresponde en su mayoría al plegamiento tipo Rossmann, el cual está presente en el dominio ThiJ que caracteriza a la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl.

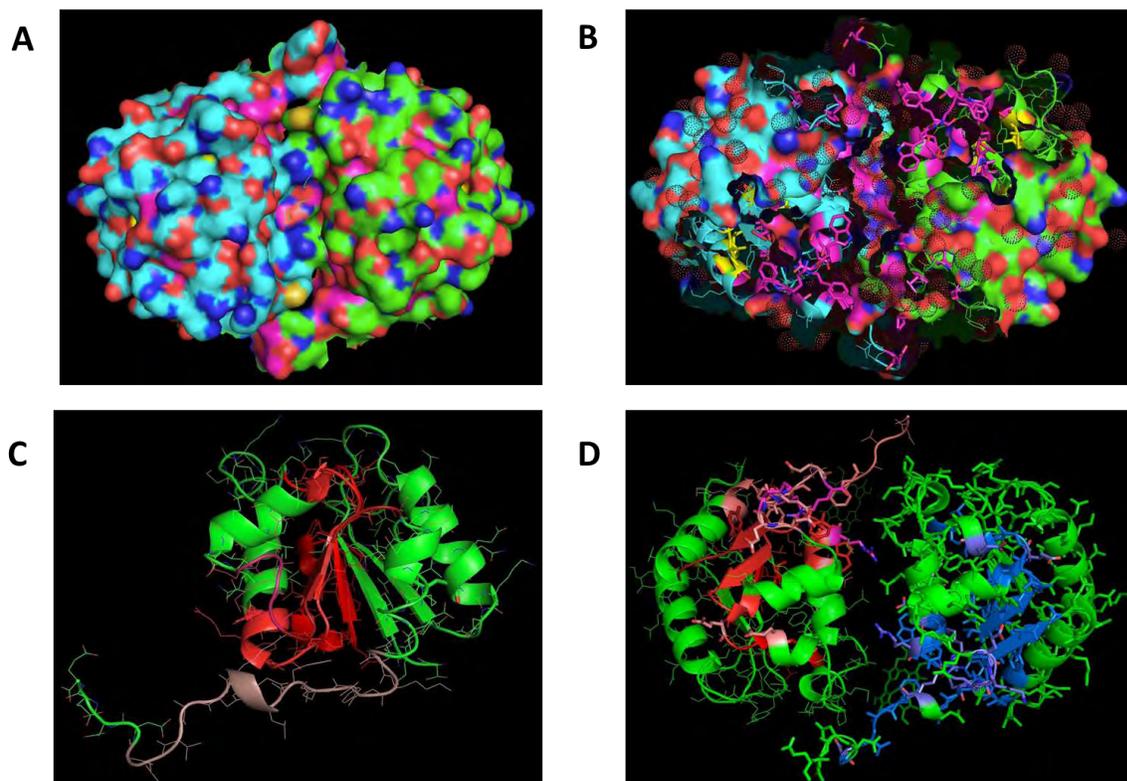


Figura 9. Aminoácidos conservados del dominio C-terminal en la estructura de la CAT-3. A) Superficie del dímero del dominio C-terminal de la CAT-3, en magenta se marcan los aminoácidos conservados de la superficie. B) Dímero del dominio C-terminal de la CAT-3 con vista al interior de la superficie, en magenta se marcan los aminoácidos conservados del interior de la proteína. C) Esquema de las estructuras secundarias del monómero del dominio C-terminal con la región conservada en rojo. D) Vista superior del dímero del dominio C-terminal de las estructuras secundarias, en rojo y azul se marca la región de aminoácidos conservados.

2. El dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande tiene una estructura semejante a las superfamilias GAT I y DJ-1/ThiJ/Pfpl

El dominio C-terminal tiene una estructura similar al plegamiento Rossmann, el cual se caracteriza por la presencia de láminas beta paralelas unidas por hélices alfa. Los elementos beta-alfa-beta se pueden repetir dos o más veces. Un plegamiento similar se encuentra en los miembros de la superfamilia GAT I, en la cual se ha incluido al dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande (Horvath y Grishin, 2001).

Siguiendo la hipótesis de que la estructura de una proteína puede determinar la función de ésta, se hizo una comparación estructural entre el dominio C-terminal de cuatro catalasas de subunidad grande y 16 miembros de la superfamilia GAT I, los cuales se enlistan en la Tabla 3. Las proteínas se escogieron a partir de un alineamiento de la estructura cristalográfica del dominio C-terminal de la CAT-1 y de la CAT-3 contra todas las proteínas del PDB, empleando para ello el servidor DALI. De las proteínas con el mayor grado de similitud se escogieron 16, cuidando que tuvieran diferentes funciones y pertenecieran a las nueve diferentes familias de esta superfamilia.

Proteína	Organismo	Función	PDB	Cadena	Selección
CAT-1	<i>Neurospora crassa</i>	Catalasa	1SY7	A	568-736
CAT-3	<i>Neurospora crassa</i>	Catalasa	4AJ9	A	545-716
PVC	<i>Penicillium vitale</i>	Catalasa	2IUF	A	500-683
HPII	<i>Escherichia coli</i>	Catalasa	4BFL	A	500-754
Pdx2 (YaaE)	<i>Bacillus subtilis</i>	Glutaminasa, Piridoxal 5'-fosfato sintasa	2NV0	A	1-196
Antranilato sintasa	<i>Serratia marcescens</i>	Antranilasa sintasa	1I7Q	B	1-193
GK2113	<i>Thermus thermophilus</i>	Imidazol glicerol fosfato sintasa	1KA9	H	1-200
PdxT	<i>Thermus thermophilus</i>	Glutaminasa, Piridoxal 5'-fosfato sintasa	2YWD	A	1-190
APC35852	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	No caracterizada	1U9C	A	1-224
Atu0886	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	No caracterizada	2FEX	A	1-188
Ta0944m (GMP sintasa)	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	GMP sintasa	2A9V	D	1-212
IGPS (Imidazol glicerol fosfato)	<i>Thermotoga maritima</i>	Imidazol glicerol fosfato sintasa	3ZR4	D	1-253

sintasa)					
Gamma-glutamil hidrolasa	<i>Danio rerio</i>	Gamma-glutamil peptidasa	4L7Q	B	1-312
GAT Tm1158	<i>Thermotoga maritima</i>	No caracterizada	1O1Y	A	1-230
CTP sintasa	<i>Escherichia coli</i>	CTP sintasa	2AD5	B	1-545
GMP sintasa	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	GMP sintasa	2D7J	A	1-209
Pdx1/2 (YaaD/E)	<i>Bacillus subtilis</i>	Glutaminasa, Piridoxal 5'-fosfato sintasa	2NV2	F	1-294
PLPS	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	Glutaminasa, Piridoxal 5'-fosfato sintasa	4WXY	H	1-304
Regulador de la transcripción	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Factor de transcripción	3ER6	B	1-209
Hsp33 (Y0R391Cp)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Peptidasa tipo cisteína, chaperona	3MII	B	1-488

Tabla 3. Lista de las proteínas seleccionadas para el alineamiento estructural de la Figura 8. La selección de estas proteínas se basó en una comparación del dominio C-terminal de la CAT-1 y de la CAT-3 contra las proteínas del PDB. En este análisis se incluyó el dominio C-terminal de otras dos catalasas de subunidad grande, así como 16 proteínas de la superfamilia GAT I. En la selección se incluyeron proteínas con diferentes funciones, como glutaminasa, GMP sintasa, sintasa del imidazol glicerol fosfato, etc.

A partir de una matriz de distancia elaborada con el valor de RMSD aparente, obtenido de una comparación de las estructuras cristalográficas de las 20 proteínas, se realizó un fenograma. Como se aprecia en la figura 10, hay similitud estructural entre el dominio C-terminal de las catalasas y los miembros de la superfamilia GAT I, ya que los valores de RMSD aparente son menores a 3.5 Å, lo que significa que al superponerse la cadena principal de átomos de ambas estructuras varían en poca distancia entre ellas. Además, se obtuvieron valores de P bajos (E-3 a E-10), lo que significa que esta similitud estructural es estadísticamente significativa (se consideró un valor P significativo de 0.05). El dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande se agrupan con la proteína Hsp33 de *S. cerevisiae* y la proteína APC35852. Estas proteínas se han considerado dentro de la superfamilia GAT I como miembros de la familia DJ-1, que también son miembros de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl.

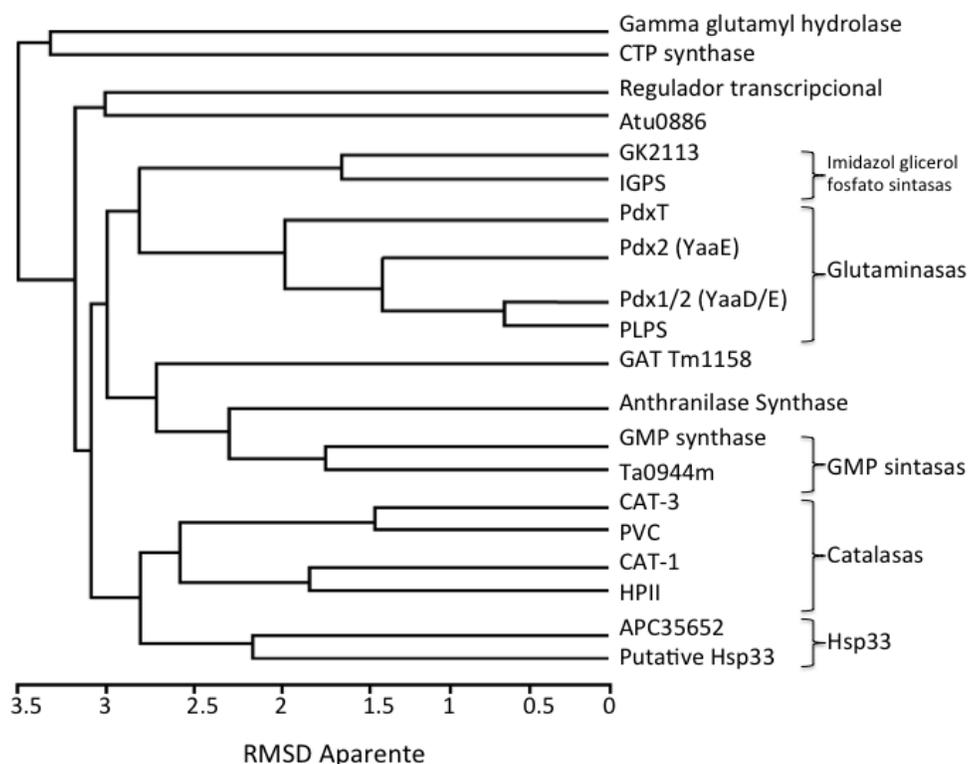


Figura 10. Fenograma de la estructura del dominio C-terminal de cuatro catalasas de subunidad grande comparada con diferentes miembros de la superfamilia GAT I. Debido a que en el alineamiento se emplearon estructuras cristalográficas que se obtuvieron con una resolución distinta (1.7 - 2.8 Å), el valor relativo de RMSD es un valor aparente. En la Tabla 3 se muestran los datos de las proteínas que se seleccionaron.

Debido al parecido en estructura que presenta el dominio C-terminal con las proteínas de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl (Shendelman *et al.*, 2004; Hansberg *et al.*, 2012) se hizo otra comparación con 16 proteínas de esta superfamilia, que se escogieron del alineamiento múltiple de estructuras cristalográficas empleando el servidor DALI. Las proteínas que se escogieron (Tabla 4) tienen diferentes funciones, como proteasa, glioxalasa y chaperona; cinco proteínas tienen dos funciones, p. ej. chaperona y glioxalasa.

Proteína	Organismo	Función	PDB	Cadena	Selección
CAT-1	<i>Neurospora crassa</i>	Catalasa	1sy7	A	568-736
CAT-3	<i>Neurospora crassa</i>	Catalasa	3ej6	A	545-716
PVC	<i>Penicillium vitale</i>	Catalasa	2iuf	A	500-683

HPII	<i>Escherichia coli</i>	Catalasa	4bfl	A	500-754
YDR533c	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Chaperona, Glioxalasa III	1qvz	A	1-230
DJ-1	<i>Homo sapiens</i>	Chaperona, Glioxalasa III	4rkw	A	1-190
Yajl (ThiJ)	<i>Escherichia coli</i>	Chaperona, Glioxalasa III	2ab0	A	1-205
YedU	<i>Escherichia coli</i>	Chaperona, Glioxalasa III	1ons	A	1-280
Hsp31	<i>Escherichia coli</i>	Chaperona, Glioxalasa III	1n57	A	1-291
VcHsp31	<i>Vibrio cholerae</i>	Chaperona, Proteasa	4i2n	A	1-286
DR1199	<i>Deinococcus radiodurans</i>	Proteasa	2vrn	B	1-190
Ton1285	<i>Thermococcus onnurineus</i>	Proteasa	3l18	A	1-168
Proteasa I	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	Proteasa	1g2i	A	1-166
DJ-1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Glioxalasa III	4qyt	A	1-194
DJ-1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Glioxalasa III	3uk7	A	1-396
bDJ-1	<i>Drosophila melanogaster</i>	Glioxalasa III	4 e08	A	1-308
YhbO	<i>Escherichia coli</i>	Glioxalasa III	1oi4	A	1-193
Glyoxilasa 3	<i>Candida albicans</i>	Glioxalasa III	4lru	A	1-239
Dominio ThiJ/Pfpl	<i>Brachyspira murdochii</i>	No caracterizada	4hcj	A	1-177
AraC	<i>Pseudomonas putida</i>	Factor de transcripción	3grA	A	1-202

Tabla 4. Lista de las proteínas seleccionadas para el alineamiento estructural de la Figura 9. La selección de estas proteínas se basó en una comparación del dominio C-terminal de la CAT-1 y de la CAT-3 contra las proteínas del PDB. En este análisis se incluyó el dominio C-terminal de otras dos catalasas de subunidad grade, así como 16 proteínas de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl. En la selección se incluyeron proteínas con diferente función, como chaperona, glioxalasa, catalasa, factor de transcripción, proteasa, no caracterizada.

Como se aprecia en la figura 11, hay una similitud estructural entre el dominio C-terminal de las catalasas y los miembros de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl, ya que presenta valores de RMSD aparente menores a 3.3 Å. También presenta valores de P bajos en el alineamiento estructural (E-3 a E-12). Esto contrasta con el alineamiento de las

secuencias que arroja valores de identidad bajos (9.8 a 14.8%) y valores de similitud bajos (22.4 a 26.9%) (Apéndice 1). En el fenograma se observa que el dominio C-terminal de la CAT-3 y de la PVC, tienen mayor semejanza con la YDR533Cp de *S. cerevisiae* y la Glioxalasa III de *Candida albicans*. Por otro lado, el dominio C-terminal de la CAT-1 y de la HP11 se asemeja también con algunas proteasas, glioxalosas y los ortólogos de DJ-1.

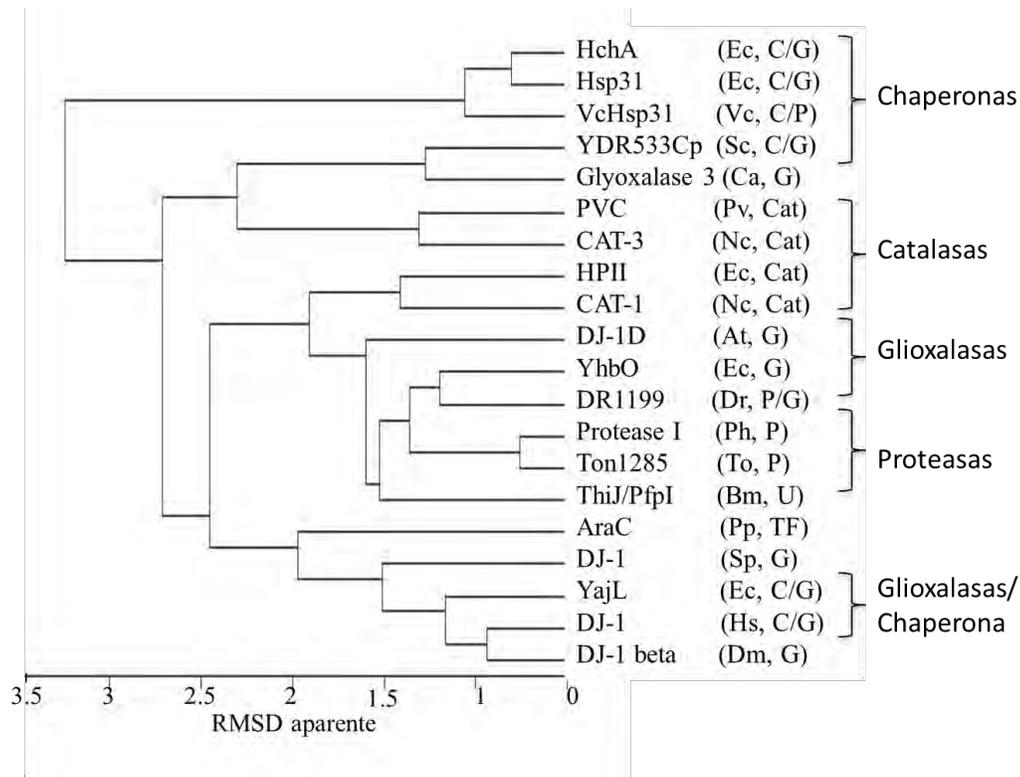


Figura 11. Fenograma de la estructura del dominio C-terminal de cuatro catalasas de subunidad grande comparada con diferentes miembros de la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI. Debido a que en el alineamiento se emplearon estructuras cristalográficas que se obtuvieron con una resolución distinta (entre 1.05 y 2.3 Å), el valor relativo de RMSD es un valor aparente. Entre paréntesis se indica la abreviación de la especie a la que pertenece la proteína y la función reportada. (At, *Arabidopsis thaliana*; Bm, *Brachyspira murdochii*; Ca, *Candida albicans*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Dr, *Deinococcus radiodurans*; Ec, *Escherichia coli*; Hs, *Homo sapiens*; Nc, *Neurospora crassa*; Pv, *Penicillium vitale*; Pp, *Pseudomonas putida*; Ph, *Pyrococcus horikoshii*; Sp, *Schizosaccharomyces pombe*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; To, *Thermococcus onnurineus*; y Vc, *Vibrio cholerae*. C, chaperona; G, glioxalasa; Cat, catalasa; TF, factor de transcripción; P, proteasa; U, no caracterizada).

Es importante mencionar que el parecido estructural que presenta el dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande con las proteínas de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl es mayor que el que presenta con las proteínas de la superfamilia GAT I. Por eso consideramos que el dominio C-terminal pertenece a la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl. Las proteínas alineadas que presentan mayor similitud estructural tienen la región central conservada descrita como el dominio ThiJ.

El dominio C-terminal de la CAT-1 y de la CAT-3 son semejantes en estructura a la DJ-1 de humano (Figura 12). Haciendo un alineamiento estructural empleando el algoritmo FATCAT flexible, el dominio C-terminal de la CAT-1 presenta un 82% de similitud estructural, con un valor de P de $1.29e-04$ (considerando un valor P significativo de 0.05) y un valor de RMSD de 2.05. En cambio, sólo tiene una identidad de secuencia del 14.6%. El dominio C-terminal de la CAT-3 presenta un 68% de similitud estructural con la DJ-1 de humano, con un valor P de $5.23e-04$ y un valor de RMSD de 2.39. En cambio sólo tiene una identidad de secuencia de 15.3%.

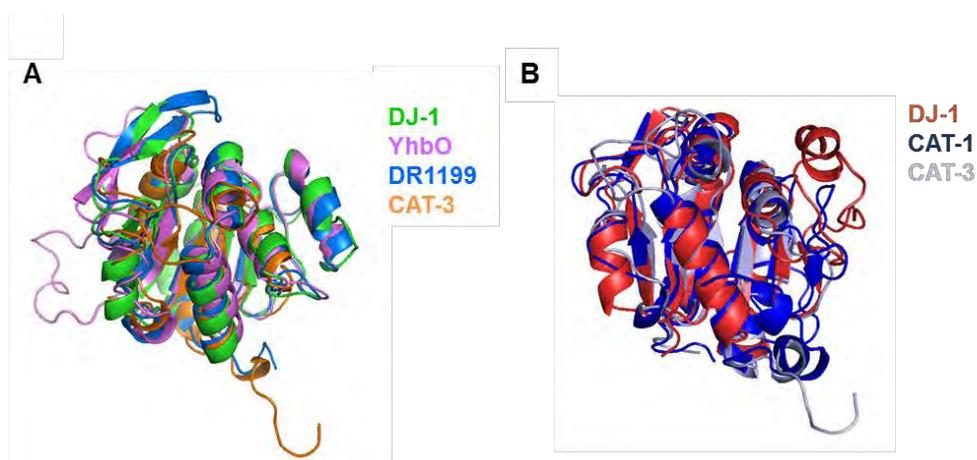


Figura 12. Alineamiento estructural del dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande y otras proteínas de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl. A) Alineamiento de las proteínas DJ-1 de humano (chaperona, glioxalasa), YhbO (glioxalasa), DR1199 (proteasa) y el dominio C-terminal de la CAT-3. B) Alineamiento de la proteína DJ-1 de humano y el dominio C-terminal de la CAT-1 y de la CAT-3.

En el alineamiento de la secuencia de aminoácidos (ver apéndice 1) se observa que el dominio C-terminal de las catalasas tiene sustituida la cisteína del sitio catalítico de las proteínas de la familia DJ-1. Esta cisteína es importante para la actividad de chaperona y de glioxalasa. Tampoco tiene los otros dos aminoácidos de la triada catalítica propios de esta superfamilia. Las catalasas de subunidad grande también tienen una estructura conservada que es parecida al dominio ThiJ, en la secuencia se observan siete regiones similares a las proteínas de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl (ver apéndice 1).

3. Expresión de la CAT-3 en la cepa UM2 de *E. coli*

Para el presente trabajo el gen de la CAT-3 se etiquetó con seis histidinas y se pasó al plásmido pCold I de expresión en frío para así favorecer la expresión de la proteína recombinante y a la vez disminuir la expresión endógena de proteína de la bacteria. Se utilizó la cepa UM2 de *E. coli* la cual carece de catalasas, ya que la catalasa HP11 es homóloga de las proteínas CAT-1 y CAT-3.

Se determinó el tiempo requerido para que la bacteria, a 16°C, llegue a la fase de crecimiento estacionario, en la cual se expresa la catalasa HP11 de *E. coli*.

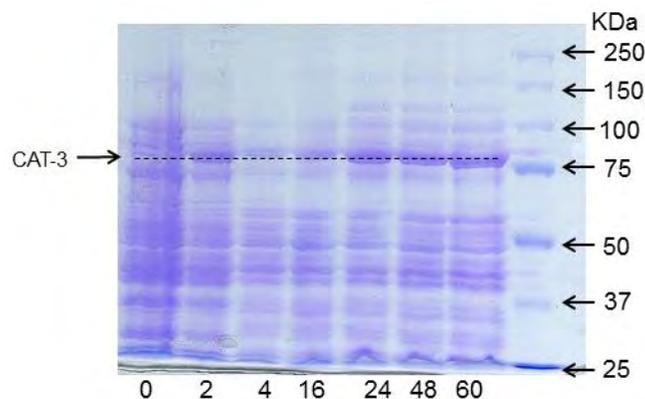


Figura 13. Estandarización de la expresión de la CAT-3 en la cepa UM2. SDS PAGE (acrilamida al 10%) con la proteína extraída a diferentes tiempos (0, 2, 4, 16, 24, 48 y 60 horas) después de la inducción. Se cargaron de cada tiempo 40 µg de proteína del extracto total. Se indica la presencia de la CAT-3 con una línea punteada.

Agregando IPTG como inductor de la expresión se observó las diferencias en la expresión de las proteínas al inicio de la fase estacionaria (24 h) y tiempos más largos (48 y 60 h). Se escogió 48 h en vista de que la expresión de la CAT-3 es similar que a las 60 h (Figura 13).

La proteína se purificó mediante una cromatografía de afinidad a la etiqueta de 6xHis en el N-terminal de la CAT-3. En la figura 14 se aprecia el resultado de la purificación de la CAT-3.

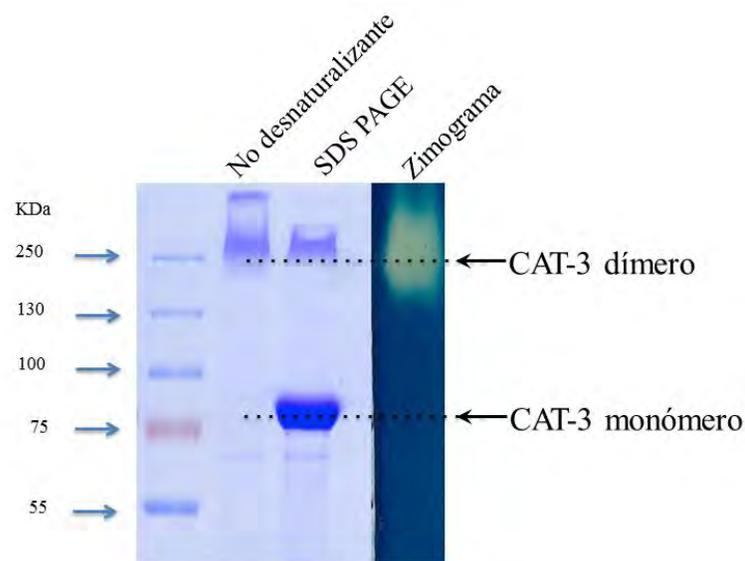


Figura 14. CAT-3 purificada a partir de su expresión en *E. coli*. Gel de poliacrilamida (acrilamida 8%) con la CAT-3 purificada por cromatografía de afinidad a la etiqueta de 6xHis. En el primer carril corrió el marcador de masa molecular; en el segundo, la proteína en condiciones desnaturalizantes, hervida por 15 min; y en el tercer carril, la CAT-3 en condiciones no desnaturalizantes. A la derecha, se muestra la actividad de catalasa en el gel, la proteína cargada corresponde a la cargada en el segundo carril en condiciones no desnaturalizantes.

4. Aislamiento del dímero de dominio C-terminal

La CAT-3 presenta 3 sitios de corte para la proteasa trombina, después de las argininas 14, 238 y 453 (Figura 15). Se podrá aislar el dímero de los dominios C-terminal del tetrámero de la CAT-3 debido a la diferencia de pesos de los segmentos que se

obtendrán de la digestión con trombina. Empleamos el dímero del dominio C-terminal aislado para comprobar si tiene actividad de chaperona como la proteína DJ-1. Se usó el dímero debido a que las chaperonas de la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI funcionan únicamente como dímeros.

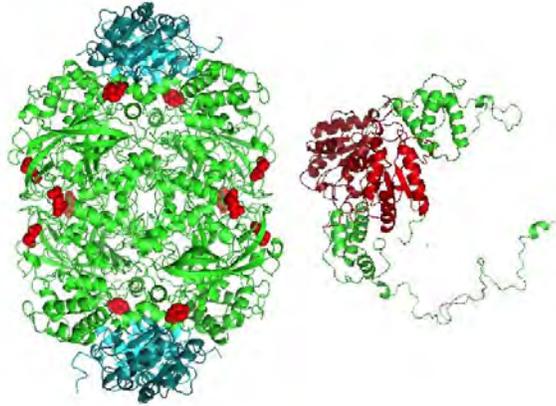


Figura 15. Digestión de la CAT-3 con la proteasa trombina. A la derecha se muestra la estructura de la CAT-3 con los cortes de trombina marcados en rojo (74, 238, 453) y el dímero del dominio C-terminal marcado en cian. A la izquierda se muestra el dímero de los dominios C-terminal.

Digiriendo la CAT-3 con trombina se obtuvo una proteína de 50 kDa, correspondiente al dímero de los dominios C-terminal, la cual se denominó C50 (Figura 16).

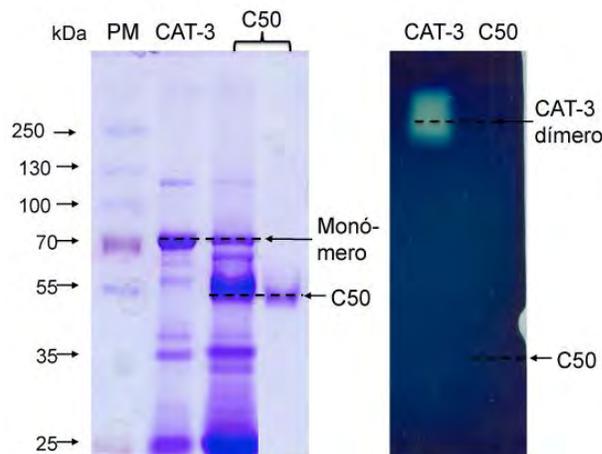


Figura 16. Aislamiento del dímero del dominio C-terminal de la CAT-3 a partir de su digestión con trombina. A la izquierda se muestra un SDS PAGE, en el primer carril se cargo el peso molecular (PM), en el segundo carril se cargo la CAT-3 sin digerir, en el tercer carril se cargo la CAT-3 digerida con trombina y en el cuarto carril se cargo la proteína C50 después de su purificación. A la derecha el zimograma de la CAT-3 y la C50, que corresponde al dímero del dominio C-terminal.

5. Ensayos de chaperona

Se emplearon diferentes ensayos de chaperona para determinar si las catalasas CAT-1 y CAT-3 protegen a otras proteínas de la desnaturalización, como es el caso de DJ-1 y de Hsp31. Para probar la protección de la desnaturalización con calor, se empleó la CS y la ADH; para la desnaturalización con un agente químico, se empleó la β -gal.

5.1 Ensayo de chaperona usando la citrato sintasa

La CS se desnaturaliza al ser incubada a 42°C. Midiendo la dispersión de la luz se sigue la desnaturalización de la CS con el tiempo. Se realizó el ensayo de chaperona por triplicado usando diferentes concentraciones de CAT-3, calculando la concentración como tetrámero. Con una relación 1:1 de CS:CAT-3 hay una protección total de la desnaturalización con calor, mientras que en concentraciones menores de CAT-3 la protección es parcial. Esto concuerda con lo observado con la CAT-1 (Figura 7). En el caso de la C50, el dímero de dominios C-terminal de la CAT-3, protege a la CS contra la desnaturalización casi igual la CAT-3 completa, ya que la concentración de C50 se calculó como dímero y en la CAT-3 hay dos dímeros del dominio C-terminal por tetrámero.

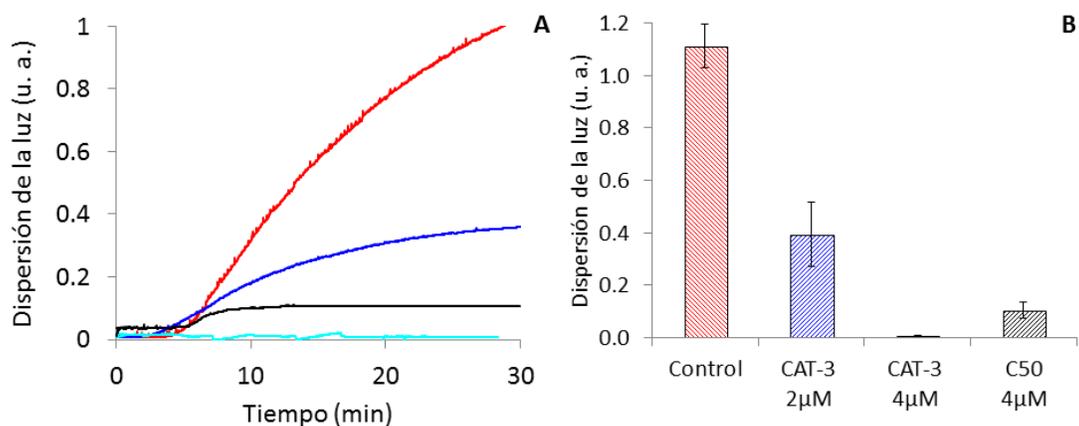


Figura 17. Protección de la desnaturalización con calor de la CS en presencia de la CAT-3. Se observa la dispersión de la luz generada por la desnaturalización de la CS a 42°C en presencia de 4 µM de albumina (control en rojo). A) Protección de la desnaturalización de la CS (4 µM) en relación directa a la concentración de la CAT-3 (2 y 4 µM) (azul oscuro y claro respectivamente) y con la C50 (dímero del dominio C-terminal de la CAT-3) (4 µM) (negro) (u. a. significa unidades arbitrarias). B) Cuantificación del efecto de la CAT-3 después de 30 min (promedio de tres experimentos).

La comparación de la protección de la CS a la desnaturalización con calor de las chaperonas DJ-1 y Hsp31 (Shendelman *et al.*, 2004; Sastry *et al.*, 2002) y las catalasas de subunidad grande de *N. crassa* se muestra en la tabla 5. La CAT-1 y la CAT-3 protegen más de la desnaturalización con calor de la CS que las proteínas DJ-1 y Hsp31. La CAT-3 protege un poco más que la CAT-1 en este ensayo.

Enzima	Concentración µM	CS [µM]	Relación (chaperona*/sustrato)	Inhibición de la agregación (%)
DJ-1 WT	4	0.8	5:1	62.0
Hsp31	2.4	0.4	6:1	80.6
CAT-1	4	4	2:1	69.2
C63	4	4	2:1	4.1
CAT-3	4	4	2:1	99.1

C50	4	4	1:1	90.5
-----	---	---	-----	------

Tabla 5. Comparación de la actividad de chaperona entre las catalasas de subunidad grande de *N. crassa*, DJ-1 y Hsp31 en el ensayo de desnaturalización con calor de la CS. * En todos los casos se considera el dímero como chaperona. Los datos experimentales de la DJ-1 y de la Hsp31 se tomaron de Shendelman *et al.*, 2004; Sastry *et al.*, 2002, respectivamente.

5.2 Ensayo de chaperona usando la alcohol deshidrogenasa

Para confirmar la protección contra la desnaturalización con calor utilizando otra proteína, se realizó un ensayo de chaperona con la ADH. La ADH se desnaturaliza al ser incubada a 45°C siguiendo la dispersión de la luz. La protección contra la desnaturalización de la ADH con la CAT-1 y con la CAT-3 se observa en la figura 18. La CAT-1 a 3 µM protege 82%, en cambio la C63 (la CAT-1 sin el dominio C-terminal) a 6 µM presenta una señal de dispersión de luz parecida al control. La CAT-3 a 3 µM protege 95% y la C50 (el dímero del dominio C-terminal de la CAT-3) a la misma concentración protege de manera similar (91%). También en este ensayo la CAT-3 protege más a la ADH que la CAT-1. Considerar que las catalasas tienen dos dímeros.

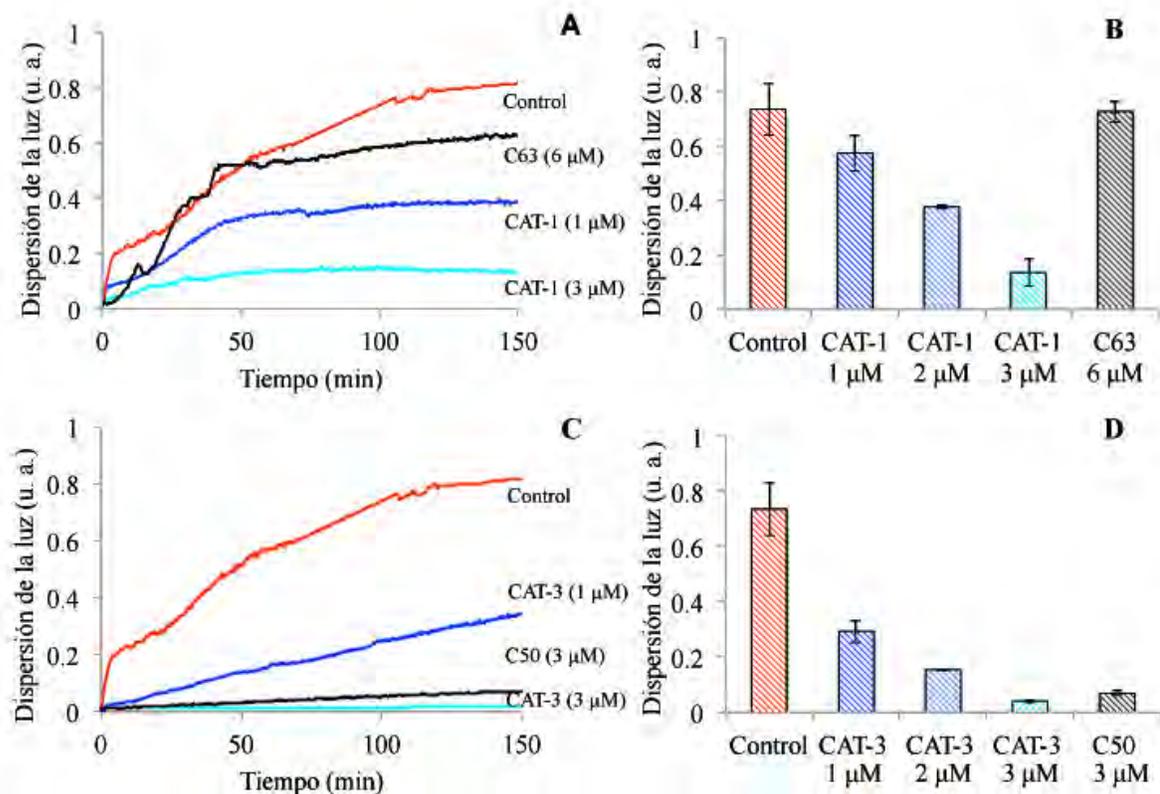


Figura 18. Protección de la desnaturalización con calor de la ADH en presencia de la CAT-1 o de la CAT-3. Se observa la dispersión de la luz (u. a. significa unidades arbitrarias) generada por el desdoblamiento de la ADH a 45°C en presencia de 6.2 μM de albumina (control en rojo). A) Protección de la desnaturalización de la ADH (6.2 μM) en relación directa con la concentración de la CAT-1 (1 y 3 μM) (azul oscuro, azul cielo y cian) y ausencia de dicho efecto con la C63 (la CAT-1 sin el dominio C-terminal) (negro). B) Cuantificación del efecto de la CAT-1 después de 150 min de incubación (promedio de tres experimentos). C) Protección de la desnaturalización de la ADH (6.2 μM) en relación directa con la concentración de la CAT-3 (1 y 3 μM) (azul oscuro, azul cielo y cian), efecto que también se observa con la C50 (correspondiente al dímero del dominio C-terminal) (negro). D) Cuantificación del efecto de la CAT-3 después de 150 min de incubación (promedio de tres experimentos).

En la tabla 6 se muestra la comparación de la protección de la ADH contra la desnaturalización con calor por parte de las chaperonas Hsp31 (Sastry *et al.*, 2002) y las catalasas de subunidad grande de *N. crassa*. La CAT-1 y la CAT-3 protegen más de la

desnaturalización con calor de la ADH, la protección del dímero del dominio C-terminal de la CAT-3 es equivalente a la protección de la CAT-3 completa, mientras que con la CAT-1 sin el dominio C-terminal no hay protección.

Enzima	Concentración [μM]	ADH [μM]	Relación (chaperona* /sustrato)	Inhibición de la agregación (%)
Hsp31	4.8	1.6	3:1	50.6
CAT-1	3	6.2	1:1	81.8
CAT-3	3	6.2	1:1	94.6
C50	3	6.2	1:2	90.8
C63	6	6.2	1:1	1.4

Tabla 6. Comparación de la actividad de chaperona de las catalasas de subunidad grande con la Hsp31 en el ensayo de desnaturalización con calor de la ADH. *En todos los casos se considera el dímero como chaperona. Los datos experimentales de la de la Hsp31 se tomaron de Sastry *et al.*, 2004.

5.3 Ensayo de chaperona usando la β-galactosidasa

La protección contra la desnaturalización de la β-gal con urea 8 M debido a la CAT-1 o la CAT-3 se determina por la disminución en la dispersión de la luz. La protección de la β-gal es proporcional con la concentración de CAT-1 o de CAT-3 (Figura 19). La C63 (CAT-1 sin el dominio C-terminal) presenta una señal similar al control. La C50 (dímero del dominio C-terminal) protege contra la desnaturalización a la β-gal de manera similar a la CAT-3 completa. La CAT-3 protege mejor que la CAT-1. Considerar que las catalasas tienen dos dímeros.

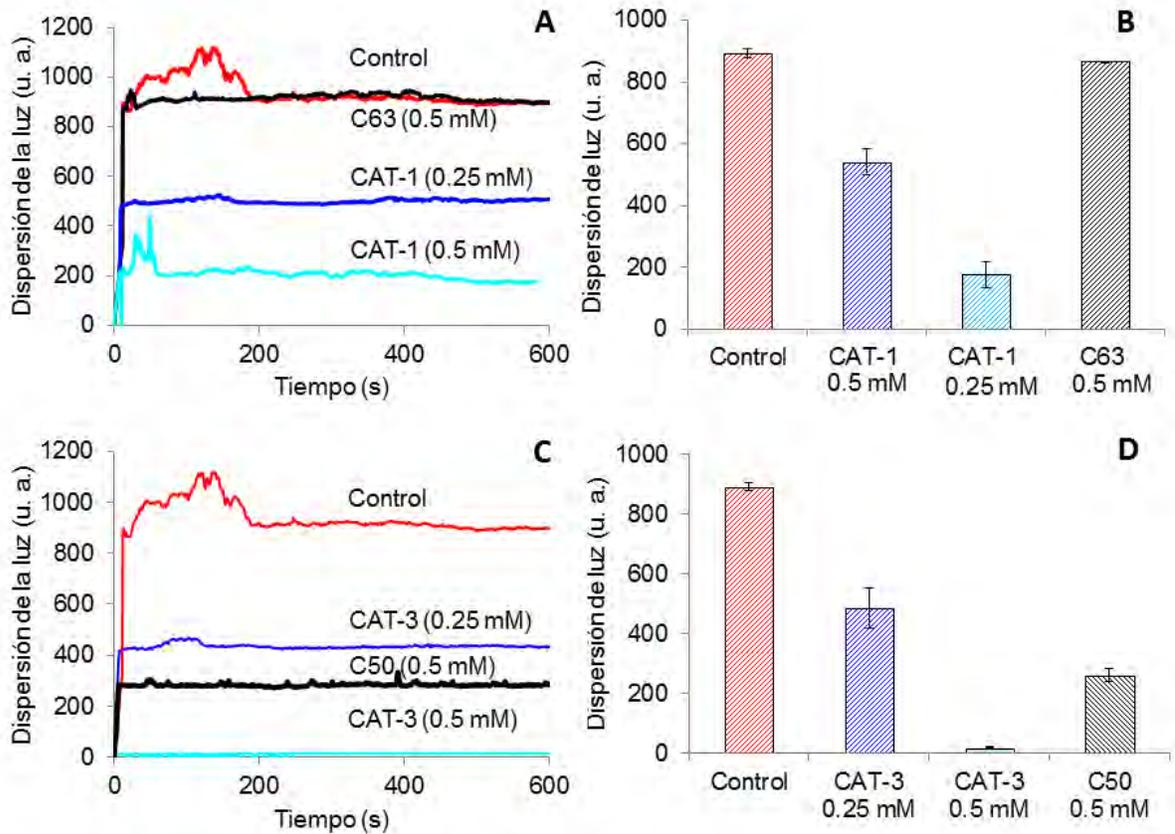


Figura 19. Protección de la desnaturación con urea de la β -gal en presencia de la CAT-1 o la CAT-3. Se observa la dispersión de la luz generada por la desnaturación de la β -gal en presencia de 8 M de urea a 25°C, con 0.5 μ M de albumina (control en rojo). A) Protección de la desnaturación de la β -gal (0.5 μ M) en relación directa con la concentración de CAT-1 (0.25 μ M y 0.5 μ M, en azul oscuro y azul claro, respectivamente) y ausencia de dicho efecto con la C63 (0.5 μ M) (negro). B) Cuantificación del efecto de la protección de la CAT-1 después de 600 s de incubación (promedio de tres experimentos). C) Protección de la desnaturación de la β -gal (0.5 μ M) en relación directa con la concentración de CAT-3 (0.25 μ M y 0.5 μ M, en azul oscuro y azul claro respectivamente) y de C50 (0.5 μ M concentración calculada como dímero, en negro). D) Cuantificación del efecto de la protección de la CAT-3 después de 600 s de incubación (promedio de tres experimentos)

Discusión

Debido a que durante el estrés celular muchas proteínas se agregan, la función de las chaperonas es muy importante. Esto ocurre también en el estrés oxidante, esto es cuando la cantidad de especies reactivas del oxígeno excede la capacidad antioxidante de la célula. En estas condiciones las ERO causan daños en la mayoría de las biomoléculas celulares, incluyendo lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Las chaperonas evitan que en el estrés oxidante muchas proteínas se desnaturalicen.

Se sabe que algunas proteínas importantes para la respuesta antioxidante de las células exhiben actividad de chaperona, protegiendo a la célula de la toxicidad debido a la agregación de las proteínas dañadas. Dentro de estas enzimas se encuentran las peroxirredoxinas Prx 2-cys, las cuales pueden actuar como chaperonas moleculares uniéndose a proteínas parcialmente desnaturalizadas, evitando así su agregación (Jang *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2005). Las Prx 2-cys tienen una baja actividad de chaperona cuando se encuentran como monómeros, que es la estructura que tiene actividad de peroxidasa, pero cuando varias de sus cisteínas conservadas se oxidan en ácido sulfínico (-SO₂H) o sulfónico (-SO₃H), cambia su estructura cuaternaria, formando dímeros o decámeros de dímeros. Con este cambio se incrementa considerablemente su actividad de chaperona, mientras que pierde su actividad como peroxidasa (Jang *et al.*, 2004; Barranco-Medina *et al.*, 2009).

Las tiorredoxinas también presentan actividad de chaperona como, por ejemplo, la Trx 1 de *E. coli* (Kern *et al.*, 2003). También la PDI, una disulfuro isomerasa que tiene dos dominios de tiorredoxina y un dominio BiP y que actúa en el retículo endoplasmático, es una chaperona que activa la toxina del cólera (Tsai *et al.*, 2001). Así mismo algunas tiorredoxina reductasas tienen actividad de chaperonas interactuando con las proteínas desnaturalizadas con el estrés celular (Kern *et al.*, 2003; Berndt *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009). El dominio de tiorredoxina (dominio Trx) de otras proteínas, como por ejemplo la AtTDX, actúa como chaperona, no sólo protegiendo de la desnaturalización a otras proteínas sino también contribuyendo a la recuperación de su plegamiento. Esta actividad

es independiente del ATP, pero requiere que las cisteínas en la proteína desnaturalizada se hayan oxidado, ya que el dominio Trx reconoce la cisteína oxidada en las proteínas desnaturalizadas (Caldas *et al.*, 2006; Berndt *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Lin, J. & Wilson M. A., 2011). Además se ha visto que las tiorredoxinas y las proteínas que contienen un dominio Trx también pueden formar oligómeros con alta temperatura. Con un choque térmico, se generan hexámeros o multímeros de dichas proteínas. La formación de oligómeros determina la actividad de la enzima: como monómero la actividad es de reductasa de disulfuro y de chaperona plegamiento; al constituirse las estructuras de mayor peso molecular, estas actividades se pierden y aumenta la actividad de mantenimiento (Lee *et al.*, 2009).

En nuestro trabajo observamos que las catalasas de subunidad grande de *N. crassa* presentan actividad de chaperona, protegiendo a otras proteínas de la desnaturalización. Posiblemente el dominio C-terminal de estas proteínas se seleccionó evolutivamente como una estrategia más ante el estrés celular (Niforou *et al.*, 2014). Al respecto, la expresión de las catalasas de subunidad grande se induce con el choque de calor en *N. crassa* y en *Aspergillus nidulans*, lo cual podría estar relacionado con su participación en la de protección de la desnaturalización de otras proteínas (Michán *et al.*, 2002; Noventa-Jordão *et al.*, 1999).

Esto contrasta con algunas catalasas de subunidad pequeña, las cuales requieren de la unión a chaperonas durante el estrés para no agregarse y mantener su actividad. Tal es el caso de las catalasas de *Arabidopsis thaliana* y de la proteína NCA1 (no catalase activity 1). Esta proteína interacciona con las catalasas y evita que se desnaturalicen en diferentes condiciones de estrés abiótico; en la mutante nula de la proteína NCA1, las tres isoformas de catalasa tienen una actividad reducida (Li *et al.*, 2015). Otro ejemplo es la catalasa de *H. sapiens* en el caso de las cataratas. El mayor daño en el tejido ocurre por la deficiencia de la catalasa en las células del cristalino debido a la agregación de la catalasa. Esta agregación se evita con la actividad de la chaperona sHSP llamada α -cristalina, la cual protege a la catalasa de su agregación en condiciones de estrés (Hook y Harding, 1996).

La actividad de chaperona de las catalasas de subunidad grande parece estar relacionada a la estructura conservada del dominio C-terminal. Este dominio pertenece a la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI. Otros miembros de esta superfamilia también presentan actividad de chaperona, a pesar de que su función principal sea otra, como es el caso de DJ-1 y de Hsp31, cuya función enzimática más importante en la célula es la de glioxalasa (Richarme *et al.*, 2014; Bankapalli *et al.*, 2015; Mihoub *et al.*, 2015).

En el presente trabajo se observó que la proteína C63 (CAT-1 sin el dominio C-terminal) no protege de manera significativa a las proteínas, en ninguno de los tres ensayos de chaperona realizados. Mientras que la proteína C50 (correspondiente al dímero de los dominios C-terminal de la CAT-3) protege a las proteínas de su desnaturalización al igual que la CAT-3 completa. La CAT-3 protege un poco más a las tres proteínas empleadas en los ensayos que la CAT-1. Así, en el ensayo de chaperona con la CS se calculó que la concentración de CAT-3 requerida para proteger al 100% a la CS es 4.5 μM y con la CAT-1 de 5.8 μM .

Para la función de las chaperonas es crítico el control de la unión y de la separación de sus sustratos. Se ha observado que las chaperonas de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfp I se unen a las regiones hidrofóbicas que son expuestas en las proteínas cuando pierden su conformación nativa, dando lugar a intermediarios desdoblados (Sastry *et al.*, 2004; Halsbeck *et al.*, 2005). Es por ello que se realizó el análisis de la superficie del dímero del dominio C-terminal de la CAT-1 y de la CAT-3 para identificar si muestra parches hidrofóbicos a los que se puedan pegar las proteínas sustrato. En la figura 20 se muestra que el dímero del dominio C-terminal de la CAT-1 y de la CAT-3, los cuales exhiben dos regiones hidrofóbicas en la superficie del dominio C-terminal que podrían ser el sitio de unión con los intermediarios parcialmente desnaturalizados de otras proteínas. En la figura 20 se muestran las dos regiones hidrofóbicas localizadas en la superficie de la Hsp31 (Ala-14, Pro-21, Leu-26, Met-101, Tyr-106, Met-109 y Phe-120 de cada monómero), que son el posible sitio de interacción con las proteínas desnaturalizadas (Lee *et al.*, 2003). La Leu-26 contribuye fuertemente a la actividad de chaperona de la

Hsp31 a altas y bajas temperaturas (Sastry *et al.*, 2004). Se muestra también la región hidrofóbica de la DJ-1 humana (Val-146, Phe-162, Leu-166, Ala-167, Ala-178 y Leu-187 de cada monómero) como posible sitio de interacción con las proteínas desdobladas (Lee *et al.*, 2003).

La proteína YDR533c, la cual se ha sugerido que tiene actividad de chaperona debido a su similitud con la familia de proteínas Hsp31 y DJ-1, también conserva dos regiones hidrofóbicas en su superficie alrededor del sitio activo, aunque no se le ha podido comprobar la actividad de chaperona por los métodos convencionales (Graille *et al.*, 2004). En contraste, en la proteína YhbO, que tiene actividad de glioxalasa pero no de chaperona, no se puede observar la presencia de parches hidrofóbicos (Figura 20).

En la figura 20 puede observarse el valor correspondiente al área hidrofóbica más grande de la superficie de las proteínas, en el caso de las proteínas con actividad de chaperona presentan un valor alto, además existe una correlación entre el área hidrofóbica y la protección a otras proteínas, por ejemplo en el caso del dímero del dominio C-terminal de la CAT-3 presenta un área hidrofóbica mayor (entre una y dos veces más) al de las proteínas CAT-1, DJ-1 y Hsp31, lo cual concuerda con que presenta una mejor actividad de chaperona. Por el contrario, las proteínas YDR533cp y YhbO tienen un área hidrofóbica menor, correlacionando con el hecho de que carecen de actividad de chaperona.

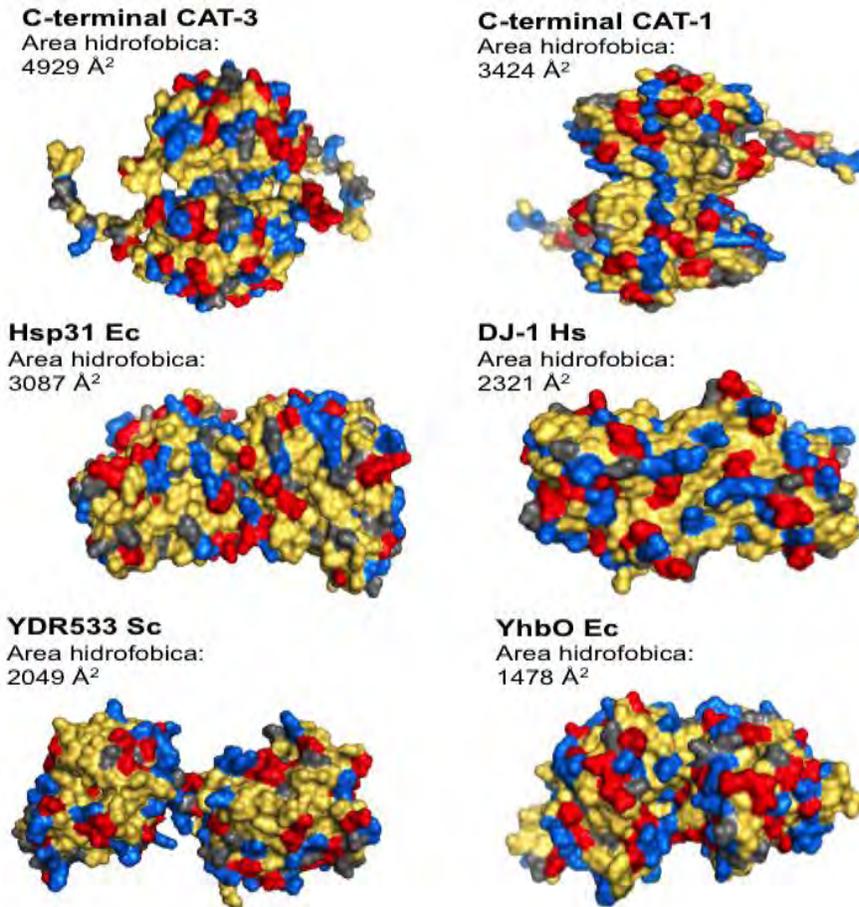


Figura 20. Superficie hidrofóbica del dímero del dominio C-terminal de la CAT-1 y de la CAT-3, y de otras proteínas de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl. Se colorearon los aminoácidos con cadenas hidrofóbicas en amarillo, los aminoácidos con cadenas cargadas positivamente en azul y negativamente en rojo, y el resto de los aminoácidos se muestran en gris. En las 6 diferentes proteínas se observan las zonas hidrofóbicas donde posiblemente se unen las proteínas parcialmente desdobladas. El área hidrofóbica de la superficie de las proteínas se midió mediante el programa PyMol. Se selecciono el área más grande en todos los caso y el resultado se muestra bajo el nombre de cada una. Arriba-izquierda, dímero del dominio C-terminal de la CAT-3 visto desde arriba. Arriba-derecha, dímero del dominio C-terminal de la CAT-1 visto desde arriba. Centro-izquierda, dímero de la chaperona Hsp31 de *E. coli*. Centro-derecha, dímero de la chaperona/ glioxalasa DJ-1 de humano. Abajo-izquierda, dímero de la chaperona YDR533cp de *S. cerevisiae*. Abajo-derecha, dímero de la proteína YhbO de *E. coli*.

Para descartar la posibilidad de que el lugar de interacción con las proteínas parcialmente desnaturizadas fuera en otro sitio, se buscaron las zonas hidrofóbicas en la superficie del tetrámero completo de las catalasas. Como se muestra en la figura 21, en la superficie del tetrámero que no corresponde al dinero del dominio C-terminal, no presentan zonas hidrofóbicas grandes y tiene un número considerable de aminoácidos con carga. Solamente en la superficie del dímero del dominio C-terminal de ambas catalasas hay una zona hidrofóbica que es tres a cuatro veces más grande que el área mayor en el resto de la proteína.

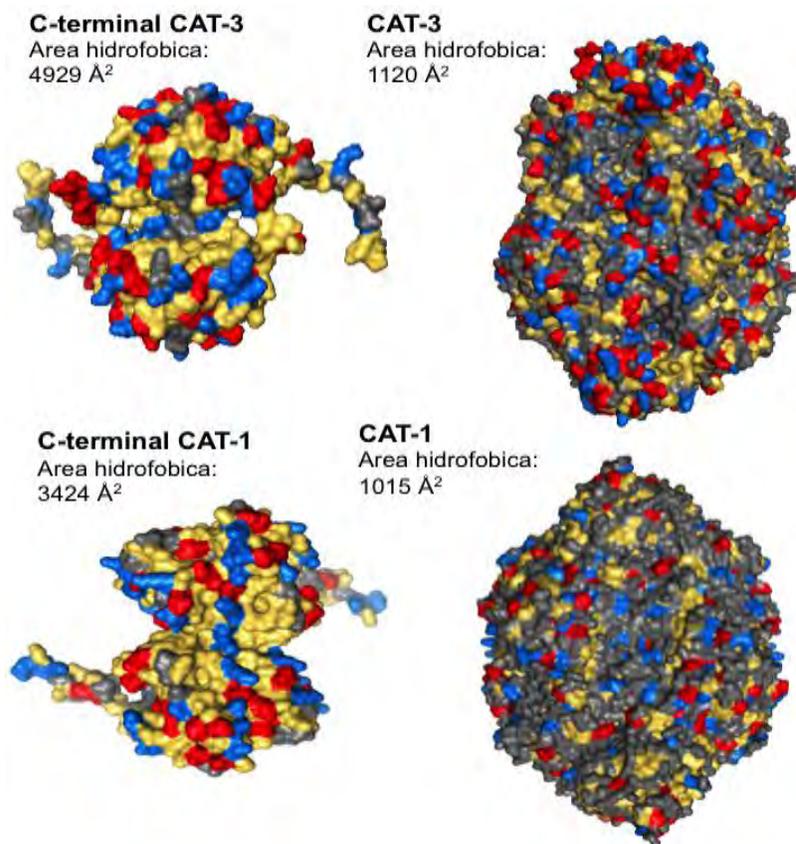


Figura 21. Zonas hidrofóbicas en la superficies de las catalasa de subunidad grande de *N. crassa* CAT-1 y CAT-3. Se colorearon los aminoácidos con cadenas hidrofóbicas en amarillo, los aminoácidos con cadenas cargadas positivamente en azul y los negativamente en rojo, el resto de los aminoácidos se muestran en gris. Zonas hidrofóbicas del dímero del dominio C-terminal de la CAT-3, vista desde arriba. El tetrámero de la CAT-3 visto de frente. Zonas hidrofóbicas del dímero del dominio C-terminal de la CAT-1, vista desde arriba. El tetrámero de la CAT-1 visto de frente.

Conclusiones

1. El dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande tiene 45 aminoácidos conservados, de los cuales 14 de ellos se encuentran en la superficie de la proteína, 27 en la región interna y cuatro en el túnel de agua.
2. Por su estructura, el dominio C-terminal pertenece a las superfamilias GAT I y DJ-1/ThiJ/Pfpl. El dominio C-terminal de la de las cuatro catalasas de subunidad grande presenta una mayor similitud estructural a las proteínas ortologas de DJ-1. El dominio C-terminal de la CAT-3 tiene mayor parecido a la Glioxalasa III de *C. albicans* y YDR533c de *S. cerevisiae*; mientras que el de la CAT-1 presenta mayor parecido con DJ-1D de *A. thaliana* y YhbO de *E. coli*.
3. La pérdida del dominio C-terminal de la CAT-1 disminuye la estabilidad de la proteína.
4. El dominio C-terminal de la CAT-3 presenta actividad de chaperona, ya que protege a otras proteínas de la desnaturalización con calor y con urea. La pérdida del dominio C-terminal de la CAT-1 genera el abatimiento de la actividad de chaperona para esta proteína.
5. El dominio C-terminal de la CAT-3 protege un poco más que la CAT-1, a pesar de que la estructura del dominio C-terminal de esta última es más parecido a DJ-1.
6. La actividad de chaperona de las catalasas no requiere de la triada catalítica de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl.
7. A diferencia del resto de la proteína, el dominio C-terminal de la CAT-1 y de la CAT-3 exhibe parches hidrofóbicos similares en tamaño a los presentados por las chaperonas de la familia DJ-1/ThiJ/Pfpl.

Perspectivas

1. Determinar si las proteínas protegidas de su desnaturalización por las catalasas de subunidad grande conservan su actividad enzimática.
2. Comparar la actividad de chaperona de la CAT-3 con otras chaperonas en nuestro ensayo y utilizar otros controles como la catalasa de bovino y la catalasa grande y la chica de *Aspergillus*.
3. Determinar la estabilidad del dímero del C-terminal aislado de la CAT-3 y si el monómero también tiene actividad de chaperona.
4. Determinar si al sustituir algunos aminoácidos de las zonas hidrofóbicas por aminoácidos hidrofílicos en el dominio C-terminal de la CAT-3 se pierde la actividad de chaperona.
5. Instrumentar un sistema de medición *in vitro* en el cual la desnaturalización de una proteína dependa de su oxidación y determinar si la CAT-3 funciona también como chaperona.
6. Determinar el fenotipo de una cepa sin el gen de *cat-3*, transformada con a) el gen de la CAT-3 en el cual el dominio C-terminal haya sido sustituido por la GFP y/o b) transformada con un dominio C-terminal etiquetado con la RFP bajo el control de un promotor inducible. El fenotipo se determinará durante la diferenciación celular y en diferentes condiciones de estrés.

Referencias

1. Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., & Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology*, 13(3), 111–118.
2. Ayling, A., & Baneyx, F. (1996). Influence of the GroE molecular chaperone machine on the in vitro refolding of *Escherichia coli* β -galactosidase. *Protein Science*, 5(3), 478–487.
3. Bandyopadhyay, S., & Cookson, M. R. (2004). Evolutionary and functional relationships within the DJ-1 superfamily. *BMC Evolutionary Biology*, 4(1), 6.
4. Bankapalli, K., Saladi, S., Awadia, S. S., Goswami, A. V., Samaddar, M., & D'Silva, P. (2015). Robust Glyoxalase activity of Hsp31, a ThiJ/DJ-1/Pfpl family member protein, is critical for Oxidative stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(44), 26491–26507.
5. Barranco-Medina, S., Lázaro, J. J., & Dietz, K. J. (2009). The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function. *FEBS Letters*, 583(12), 1809–1816.
6. Berlin, V., & Yanofsky, C. (1985). Protein changes during the asexual cycle of *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology*, 5(4), 839–848.
7. Berndt, C., Lillig, C. H., & Holmgren, A. (2008). Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783(4), 641–650.
8. Borkovich, K., Alex, L., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G., Read, N., Seiler S., Bell-Pedersen D. *et al.* (2004). Lessons from the genome sequence of *Neurospora*

crassa: Tracing the path from Genomic blueprint to Multicellular organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(1), 1–108.

9. Brand, M. D., Affourtit, C., Esteves, T. C., Green, K., Lambert, A. J., Miwa, S., & Parker, N. (2004). Mitochondrial superoxide: Production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(6), 755–767.
10. Buchner, J., Grallert, H., & Jakob, U. (1998). Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein. *Methods in Enzymology*, 290(27), 323–338.
11. Caldas, T., Malki, A., Kern, R., Abdallah, J., & Richarme, G. (2006). The *Escherichia coli* thioredoxin homolog YbbN/Trxsc is a chaperone and a weak protein oxidoreductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343(3), 780–786.
12. Cano-Dominguez, N., Alvarez-Delfin, K., Hansberg, W., & Aguirre, J. (2008). NADPH Oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory Subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 7(8), 1352–1361.
13. Chelikani, P., Donald, L. J., Duckworth, H. W., & Loewen, P. C. (2003). Hydroperoxidase II of *Escherichia coli* exhibits enhanced resistance to proteolytic cleavage compared to other Catalases †. *Biochemistry*, 42(19), 5729–5735.
14. Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 61(2), 192–208.

15. D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 813–824.
16. Davis, R. H. (2000). *Neurospora: Contributions of a model organism* (1st ed.). USA: Oxford University Press.
17. Davis, R. H., & de Serres, F. J. (1970). Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Metabolism of Amino Acids and Amines Part A*, 17(4), 79–143.
18. Davis, R. H., & Perkins, D. D. (2002). TIMELINE *Neurospora*: A model of model microbes. *Nature Reviews Genetics*, 3(5), 397–403.
19. Díaz, A., Horjales, E., Rudiño-Piñera, E., Arreola, R., & Hansberg, W. (2004). Unusual Cys-Tyr covalent bond in a large catalase. *Journal of Molecular Biology*, 342(3), 971–985.
20. Díaz, A., Valdés, V.-J., Rudiño-Piñera, E., Horjales, E., & Hansberg, W. (2009). Structure–function relationships in fungal large-subunit catalases. *Journal of Molecular Biology*, 386(1), 218–232.
21. Díaz, A., Rangel, P., Montes de Oca, Y., Lledías, F., & Hansberg, W. (2001). Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11), 1323–1333.
22. Fukui, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide Dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(6), 1583–1606.

23. Galagan, J., Calvo, S., Borkovich, K., Selker, E., Read, N., Jaffe, D., Fitzhugh, W., Ma, L. *et al.* (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 422(6934), 859–868.
24. Graille, M., Quevillon-Cheruel, S., Leulliot, N., Zhou, C., de La Sierra Gallay, I., Jacquamet, L., Ferrer, J., Liger, D., *et al.* (2004). Crystal Structure of the YDR533c *S. cerevisiae* Protein, a Class II Member of the Hsp31 Family. *Structure*, 12(5), 839-847
25. Garcia-Vallve, S., Palau, J., & Romeu, A. (1999). Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Molecular Biology and Evolution*, 16(9), 1125–1134.
26. Hansberg Torres, W. (2008). El dioxígeno y sus especies reactivas. In M. Konigsberg Fainstein, Radicales libres y estrés oxidativo (1st ed., pp. 25-46). México: Manual Moderno
27. Hansberg W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico*, Vo. XXVI, 19-54.
28. Hansberg, W., Salas-Lizana, R., & Domínguez, L. (2012). Fungal catalases: Function, phylogenetic origin and structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 170–180.
29. Hartl, F. U. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561), 1852–1858.
30. Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356), 324–332.

31. Holm, L., & Rosenstrom, P. (2010). Dali server: Conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Research*, 38(Web Server), W545–W549.
32. Hook, D. W. A., & Harding, J. J. (1996). Alpha-crystallin acting as a molecular chaperone protects catalase against steroid-induced inactivation. *FEBS Letters*, 382(3), 281–284.
33. Horvath, M. M., & Grishin, N. V. (2001). The c-terminal domain of HP11 catalase is a member of the type I glutamine amidotransferase superfamily. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 42(2), 230–236.
34. Horwitz, J. (1992). Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(21), 10449–10453.
35. Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23–28.
36. Jang, H., Lee, K., Chi, Y., Jung, B., Park, S., Park, J., J. H., Lee, J. R., Lee, S. S. et al. (2004). Two enzymes in one. *Cell*, 117(5), 625–635.
37. Kern, R., Malki, A., Holmgren, A., & Richarme, G. (2003). Chaperone properties of *Escherichia coli* thioredoxin and thioredoxin reductase. *Biochemical Journal*, 371(3), 965–972.
38. Klotz, M. G., Klassen, G. R., & Loewen, P. C. (1997). Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Molecular Biology and Evolution*, 14(9), 951–958.
39. Konigsberg, M. (2008). *Radicales libres y estrés oxidativo: Aplicaciones médicas* (1st ed.). México: MANUAL MODERNO.

40. Kumar, C., Igbaria, A., D'Autreaux, B., Planson, A., Junot, C., Godat, E., Bachhawat, A. K., Delaunay-Moisan, A. *et al.* (2011). Glutathione revisited: A vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *EMBO Journal*, 30(10), 2044–2056.
41. Kuo, H.-C., Hui, S., Choi, J., Asiegbu, F. O., Valkonen, J. P. T., & Lee, Y.-H. (2014). Secret lifestyles of *Neurospora crassa*. *Scientific Reports*, 4(5135), 1–6.
42. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
43. Lauter, F.-R., & Russo, V. E. A. (1991). Blue light induction of conidiation-specific genes in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6883–6886.
44. Lee S. J., Kim S. J., Kim I. K., Ko J., Jeong C. S., Kim G. H., Park C., Kang S. O. *et al.* (2003). Crystal structures of human DJ-1 and *Escherichia coli* Hsp31, which share an evolutionarily conserved domain. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 44552–44559.
45. Lee, J., Lee, S., Jang, H., Lee, Y., Park, J., Park, S., Moon J. C., Park S. K. *et al.* (2009). Heat-shock dependent oligomeric status alters the function of a plant-specific thioredoxin-like protein, AtTDX. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), 5978–5983.
46. Li, J., Liu, J., Wang, G., Cha, J., Li, G., Chen, S., Li, Z., Guo, J., Zhang, C., Yang, Y. *et al.* (2015). A chaperone function of NO CATALASE ACTIVITY1 is required to maintain catalase activity and for multiple stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 27(3), 908–925.

47. Li, Z., Natarajan, P., Ye, Y., Hrabe, T., & Godzik, A. (2014). POSA: A user-driven, interactive multiple protein structure alignment server. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W240–W245.
48. Lin, J., & Wilson, M. A. (2011). *Escherichia coli* Thioredoxin-like protein YbbN contains an atypical Tetratricopeptide repeat motif and is a negative regulator of GroEL. *Journal of Biological Chemistry*, 286(22), 19459–19469.
49. Lledías, F., Rangel, P., & Hansberg, W. (1998). Oxidation of catalase by singlet oxygen. *Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10630–10637.
50. Lucas, J. I., & Marín, I. (2007). A new evolutionary paradigm for the Parkinson disease gene DJ-1. *Molecular Biology and Evolution*, 24(2), 551–561.
51. Malki, A., Kern, R., Abdallah, J., & Richarme, G. (2003). Characterization of the *Escherichia coli* YedU protein as a molecular chaperone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(2), 430–436.
52. Massière, F., & Badet-Denisot, M. (1998). The mechanism of glutamine-dependent amidotransferases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 54(3), 205–222.
53. Michán, S., Lledías, F., & Hansberg, W. (2003). Asexual development is increased in *Neurospora crassa* cat-3-Null mutant strains. *Eukaryotic Cell*, 2(4), 798–808.
54. Michán, S., Lledías, F., Baldwin, J. D., Natvig, D. O., & Hansberg, W. (2002). Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(4), 521–532.
55. Mihoub, M., Abdallah, J., Gontero, B., Dairou, J., & Richarme, G. (2015). The DJ-1 superfamily member Hsp31 repairs proteins from glycation by methylglyoxal and

glyoxal. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 463(4), 1305–1310.

56. Montes de Oca, Y. (1999) Detección intracelular de catalasas durante el ciclo de crecimiento y conidiación de *Neurospora crassa*. Tesis de licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F
57. Moon, J., Hah, Y., Kim, W., Jung, B., Jang, H., Lee, J., Kim, S. Y., Lee, Y. M., *et al.* (2005). Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys Peroxiredoxin Isotype II that enhances HeLa cell resistance to H₂O₂-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 280(31), 28775–28784.
58. Muller, F. L., Liu, Y., & Van Remmen, H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49064–49073.
59. *Neurospora* LIFE CYCLE. Retrieved November 29, 2016, from <http://www.fgsc.net/neurospora/sectionB2.htm>
60. Niforou, K., Cheimonidou, C., & Trougakos, I. P. (2014). Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance. *Redox Biology*, 2, 323–332.
61. Noventa-Jordão, M. A., Couto R. M., Goldman M. H., Aguirre, J., Iyer, S., Caplan, A., Terenzi, H. F., Goldman G. H., *et al.* (1999). Catalase activity is necessary for heat-shock recovery in *Aspergillus nidulans* germlings. *Microbiology*, 145(11), 3229–3234.
62. Perkins, D. D., & Turner, B. C. (1988). *Neurospora* from natural populations: Toward the population biology of a haploid eukaryote. *Experimental Mycology*, 12(2), 91–131.

63. Davis, R. & Perkins, D. (2002). TIMELINE *Neurospora*: a model of model microbes. *Nature Reviews Genetics*, 3(5), 397-403.
64. Richarme, G., Mihoub, M., Dairou, J., Bui, L. C., Leger, T., & Lamouri, A. (2014). Parkinsonism-associated protein DJ-1/park7 is a major protein deglycase that repairs methylglyoxal- and glyoxal-glycated cysteine, arginine, and lysine residues. *Journal of Biological Chemistry*, 290(3), 1885–1897.
65. Richmond, C. (1999). Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*, 27(19), 3821–3835.
66. Rutherford, S. L., & Lindquist, S. (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, 396(6709), 336–342.
67. Saibil, H. (2013). Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(10), 630–642.
68. Sarabia Sánchez, M. (2016). Papel de los componentes de la cascada de *mak-2*, *nrc-1* y *ste50*, durante el crecimiento y la diferenciación celular en *Neurospora crassa*. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.
69. Sastry, M. S. R. (2002). Hsp31, the *Escherichia coli* yedU Gene Product, is a molecular chaperone whose activity is inhibited by ATP at high temperatures. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 46026–46034.
70. Sastry, M. S. R., Quigley, P. M., Hol, W. G. J., & Baneyx, F. (2004). The linker-loop region of *Escherichia coli* chaperone Hsp31 functions as a gate that modulates high-affinity substrate binding at elevated temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(23), 8587–8592

71. Lineage for Superfamily c.23.16: Class I glutamine amidotransferase-like SCOPe: Structural Classification of Proteins — extended. Release 2.06 (updated 2016-10-27, stable release February 2016) Copyright © 1994-2016 The SCOP and SCOPe authors. <http://scop.berkeley.edu/sunid=52317>
72. Sevinc, M. S., Switala, J., Bravo, J., Fita, I., & Loewen, P. C. (1998). Truncation and heme pocket mutations reduce production of functional catalase HPII in *Escherichia coli*. *Protein Engineering Design and Selection*, 11(7), 549–555.
73. Shendelman, S., Jonason, A., Martinat, C., Leete, T., & Abeliovich, A. (2004). DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits α -synuclein aggregate formation. *PLoS Biology*, 2(11), e362.
74. Shiu, P. K., & Glass, N. L. (2000). Cell and nuclear recognition mechanisms mediated by mating type in filamentous ascomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 3(2), 183–188.
75. Teo, J. W. P., Kum, S., Jureen, R., & Lin, R. T. P. (2015). Molecular characterization of a Catalase-Negative *Staphylococcus aureus* blood culture isolate: TABLE 1. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(11), 3699–3701.
76. Tesmer, J. J. G., Klem, T. J., Deras, M. L., Davisson, V. J., & Smith, J. L. (1996). The crystal structure of GMP synthetase reveals a novel catalytic triad and is a structural paradigm for two enzyme families. *Nature Structural Biology*, 3(1), 74–86.
77. Toledo, I., Aguirre, J., & Hansberg, W. (1986). Aerial growth in *Neurospora crassa*: Characterization of an experimental model system. *Experimental Mycology*, 10(2), 114–125.

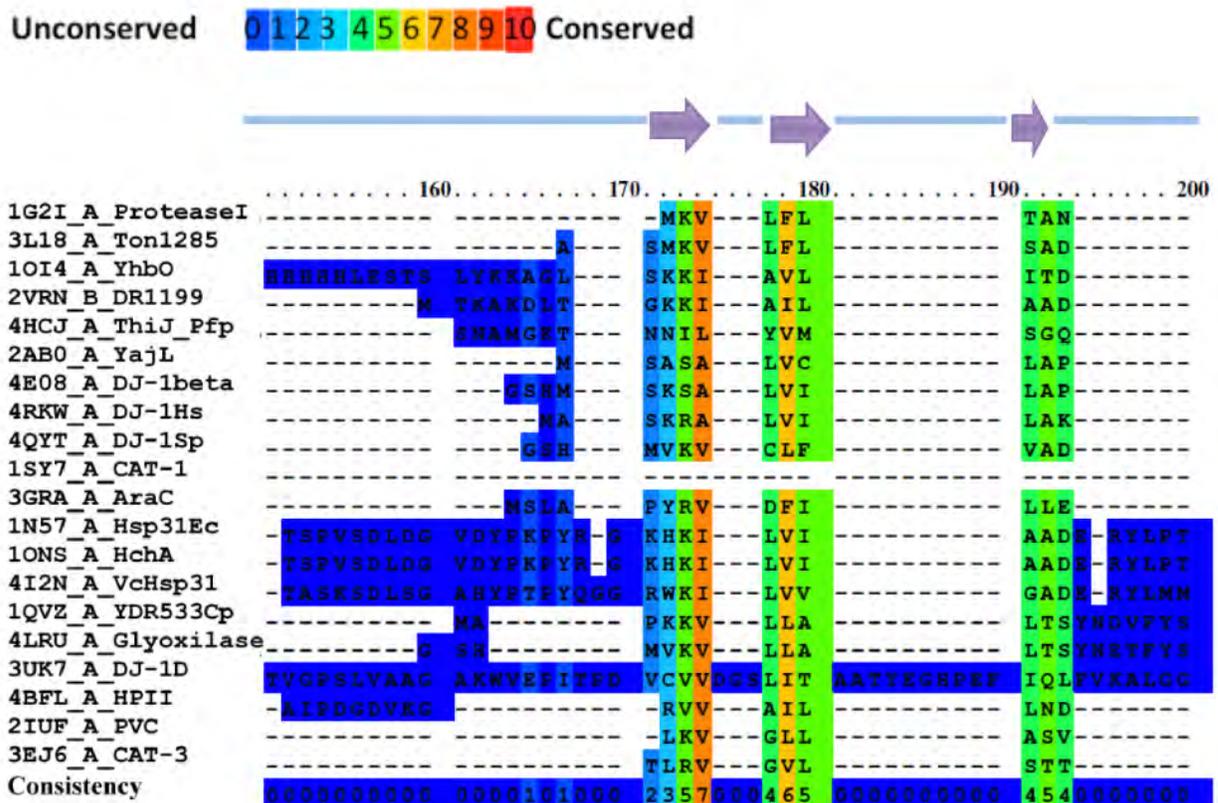
78. Tsai, B., Rodighiero, C., Lencer, W. I., & Rapoport, T. (2001). Protein disulfide isomerase (PDI) acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin (CT). *Gastroenterology*, *120*(5), A697.
79. Turian, G., & Bianchi, D. E. (1972). Conidiation in *Neurospora*. *The Botanical Review*, *38*(1), 119–154.
80. Wei, Y., Ringe, D., Wilson, M. A., & Ondrechen, M. J. (2007). Identification of functional subclasses in the DJ-1 Superfamily proteins. *PLoS Computational Biology*, *3*(1), e10.
81. Weiss, B., & Turian, G. (1966). A study of conidiation in *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology*, *44*(3), 407–418.
82. Zhao, Y. (2004). Structural studies of the YedU stress protein. Thesis dissertation, University of Texas. Galveston, Texas.
83. Zámocký, M., Gasselhuber, B., Furtmüller, P. G., & Obinger, C. (2012). Molecular evolution of hydrogen peroxide degrading enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *525*(2), 131–144.
84. Zárate-Romero, A., Stojanoff, V., Rojas-Trejo, S. P., Hansberg, W., & Rudiño-Piñera, E. (2013). Conformational stability and crystal packing: Polymorphism in *Neurospora crassa* CAT-3. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, *69*(7), 753–758.

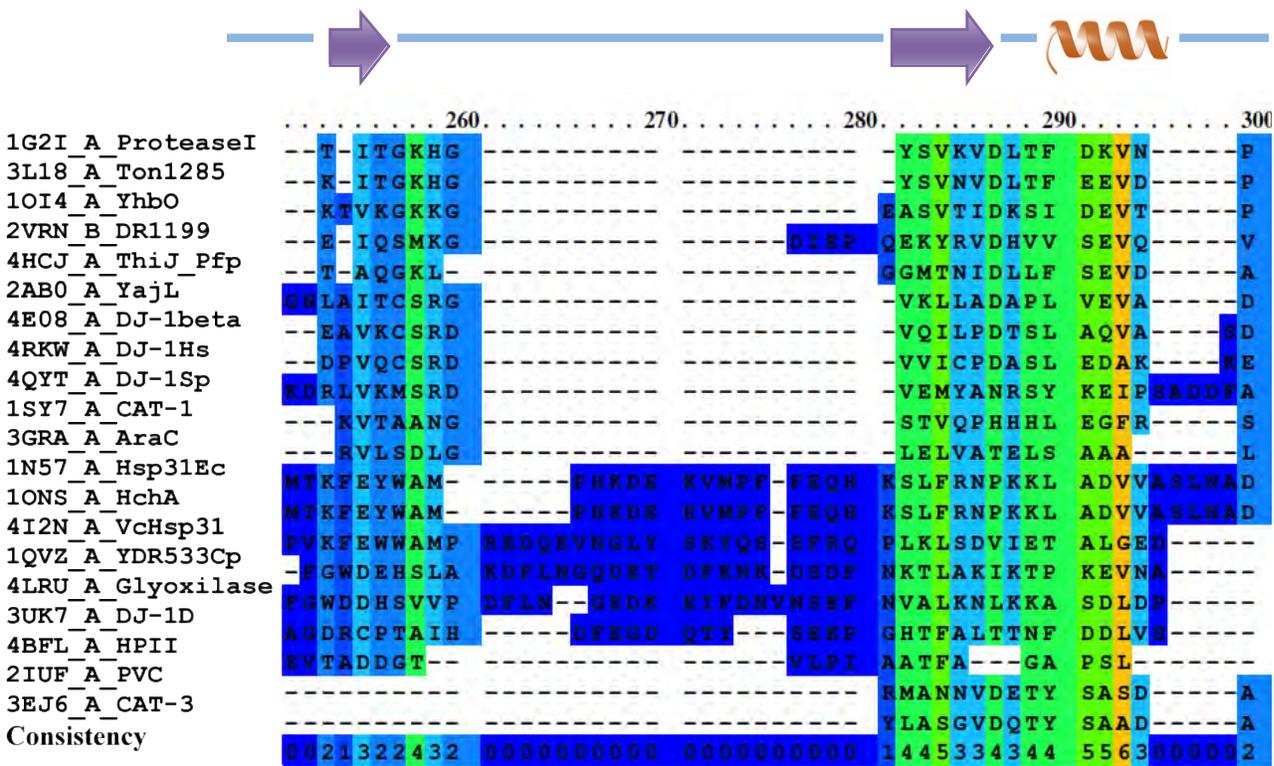
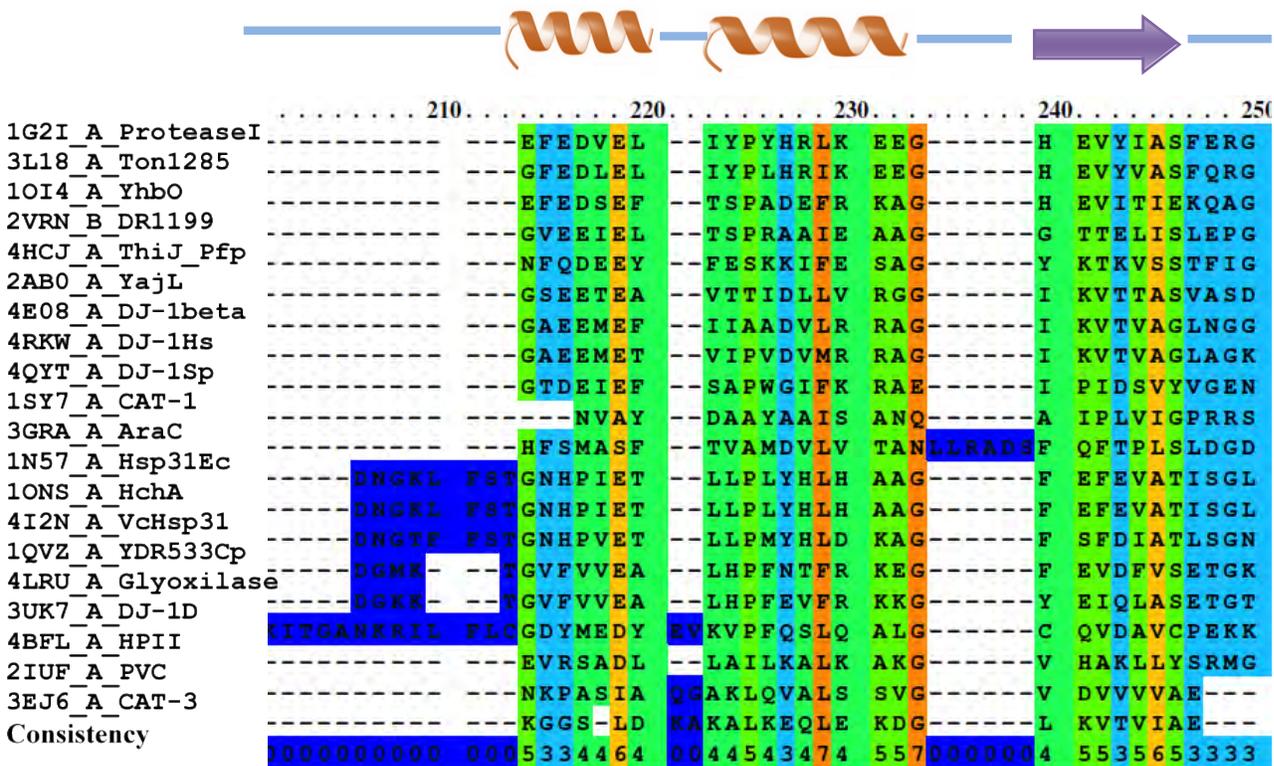
Apéndice I

Las miembros de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfp I contienen un dominio conservado (ThiJ) que está relacionado estructuralmente con el dominio glutamino-amidotransferasa tipo I (GAT), aunque el papel biológico de este dominio aun no está claro (Lee *et al.*, 2003; Bandyopadhyay y Cookson, 2004). El dominio C-terminal de la catalasa HPII de *E. coli* es un miembro de la super familia GAT, además de que es parecido al dominio ThiJ (Horvath y Grishin, 2001).

Para determinar si el dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande presentan ese dominio ThiJ se realizó un alineamiento de las secuencia del dominio C-terminal de cuatro catalasas de subunidad grande con otros miembros de la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI.

Figura suplementaria 1. Alineamiento de las 20 secuencias de las proteínas usadas en el alineamiento estructural del dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande y







	360	370	380	390	400					
1G2I_A_ProteaseI	GK	PVASICH	GP	QILISA	-----	GVLR	GRKGT	SYPGI	KDDMINA	-G-
3L18_A_Ton1285	DK	PVASICH	GP	QILISA	-----	KVLK	GRRGT	STITI	RDDVINA	-G-
1OI4_A_YhbO	GK	PVFAICH	GP	QLLISA	-----	DVIR	GRKLT	TAVKPI	IIDVKNA	-G-
2VRN_B_DR1199	GK	PIAAICH	GP	WLSSET	-----	GIAQ	GLKMT	SWSSL	KRETLA	-G-
4HCJ_A_ThiJ_Pfp	QK	IVAGIGS	GV	VIMANA	-----	KILE	EINVT	CLSAD	ESHVRHG	-N-
2AB0_A_YajL	GR	IVAAICA	AP	TVLVPH	-----	DIFP	IGNMT	GFPTL	KDKIPA	---
4E08_A_DJ-1beta	GG	LIAAICA	AP	TVLAKH	-----	GVAS	GKSLT	SYPSM	KPQLVNN	-Y-
4RKW_A_DJ-1Hs	KG	LIAAICA	GP	TALLAH	-----	EIGF	GSKVT	TTHPLA	KDKMMNG	-GH
4QYT_A_DJ-1Sp	PN	KWIGMICA	GT	LTAKTS	-----	GL-P	NKQIT	GHPSV	RGQLEEG	-G-
1SY7_A_CAT-1	LK	AIGATGE	AV	DLVAKA	-----	IALP	QVTVS	SEAEV	HESYGVV	-T-
3GRA_A_AraC	GM	ALGGLWN	GA	WFLGRA	-----	GVLD	DYGCS	SIHPEQ	RASLSERS	SPQ
1N57_A_Hsp31Ec	DR	FVISLCH	GP	AAFLALR	----	HGDN	NPLN	GYSICA	FPDA	ADKQTPEIGY
1ONS_A_HchA	DR	FVISLCH	GP	AAFLALR	----	HGDN	NPLN	GYSICA	FPDA	ADKQTPEIGY
4I2N_A_VcHsp31	NK	FIIISLCH	GP	AAFLAVG	----	DDPL	FAG	GKIVAF	FPDE	MDAQTPSIGY
1QVZ_A_YDR533Cp	GG	VVAAVCH	GP	AMFDGLT	DKKT	GRPLIE	GKSIT	GFPTDV	GETIMG	VDSI
4LRU_A_Glyoxilase	GG	VVSAVCH	GP	AIFENLN	DPKT	GEPLIK	GKKIT	GFPTDI	GEDILG	VTDI
3UK7_A_DJ-1D	EK	PVASICH	GQ	QILAAA	-----	GVLK	GRKCTAY	---	---	---
4BFL_A_HPII	LK	PIALAGD	AR	KFKATIK	----	IADQ	GEE	GIVEAD	SADG	SFMD
2IUUF_A_PVC	GK	TVGALGS	GS	DALESQ	ISSER	QGVYT	GKNAGD	--AF	AKDIK	SGLST
3EJ6_A_CAT-3	GK	PVAAVGS	AK	KALQSIG	VEEKE	AGVYA	GA	--QD	--EV	IKGVEEGLKV
Consistency	450	3956755	750	3564540	0000003	644	6344	643344	33343230	30



	410	420	430	440	450					
1G2I_A_ProteaseI	V	----	EWVDA	EVVVDGN	--W	VSSRVPADLY	AWMREFV	KLL	K	-----
3L18_A_Ton1285	A	----	EWIDA	EVVVDGN	--W	VSSRHPGDLY	AWMREFV	KLL	H	-----
1OI4_A_YhbO	A	----	EFYDQ	EVVVDKDG	-L	VTSRTPDDL	AFNREAL	RLL	GA	-----
2VRN_B_DR1199	A	----	QWVDE	ECVTD	-KG	-V	VTSRKPDDL	AFNKKIVEEF	AEGDHSSRRK	
4HCJ_A_ThiJ_Pfp	A	----	NIMSE	NVVVS	-GN	-I	VTANGPTSSK	DFANAVGV	LSL	-----
2AB0_A_YajL	E	----	QWLDK	RVVWDARV	K	L	LTSQGP	GTAI	DFGLKI	IDLL
4E08_A_DJ-1beta	S	----	YVDDK	TVVKDGN	--L	ITSRGP	GTAY	EFALKIAEEL	AGREKVQ	EVA
4RKW_A_DJ-1Hs	Y	----	TYSEN	RVEKDGL	-I	LTSRGP	GTSF	EFALAI	VEAL	NGKEVAAQVK
4QYT_A_DJ-1Sp	Y	----	KYLDQ	PVPLEEN	--L	ITSQGP	GTAM	LFGLKLE	QV	ASKDKYNAVY
1SY7_A_CAT-1	L	----	KKVKP	ESFTDAV	--K	IAKGAAG	FLG	EFFYAIA	QHR	NWDRELDGLH
3GRA_A_AraC	T	----	RITPA	SFTLDRD	--R	LSAASP	NGAM	ELMLGL	VRR	YGDGLAEGVE
1N57_A_Hsp31Ec	MP	GH	L	TWYFG	EEL	KKMG	MNI	IN	--	DDITGR
1ONS_A_HchA	MP	GH	L	TWYFG	EEL	KKMG	MNI	IN	--	DDITGR
4I2N_A_VcHsp31	MP	GH	L	TWKFG	EQL	QAIG	FEL	LN	--	TGISGQ
1QVZ_A_YDR533Cp	L	K	AKN	LATVE	D	VAK	YGAKY	LAP	VGP	WDDY
4LRU_A_Glyoxilase	M	K	GN	LLTIK	Q	V	KEGATY	I	E	PEGP
3UK7_A_DJ-1D	-	P	----	AVK	L	N	V	GGGTW	LE	--
4BFL_A_HPII	----	ELL	TLMAAH	--RV	-----	W	-----	-----	-----	SRIPK
2IUUF_A_PVC	F	----	KFLDR	FAVDE	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3EJ6_A_CAT-3	F	----	KFLER	FAVDG	DEE	-----	-----	-----	-----	-----
Consistency	30000	33434	44635	23003	54222	42322	34223	25232	22111	121221