



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**L A FUNCIÓN DE CHAPERONA DE LAS CATALASAS DE SUBUNIDAD GRANDE**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**Doctora en Ciencias**

**PRESENTA:**

**TERESA BEATRIZ NAVA RAMÍREZ**

**TUTOR PRINCIPAL**

**DR. WILHELM HANSBERG Y TORRES**

**Instituto de Fisiología Celular**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**DR. ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO**

**Facultad de Medicina, UNAM**

**DRA. LILIANA QUINTANAR VERA**

**CINVESTAV Zacatenco, IPN**

**Ciudad de México, Diciembre, 2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**

**Tesis Digitales**

**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Jurado asignado**

Presidente: Dra. Alejandra Covarrubias Robles

Vocal: Dra. Rosario Muñoz Clares

Vocal: Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez

Vocal: Dr. Miguel Costas Basin

Secretario: Dr. Ismael Bustos Jaimes

“Todos estamos conectados;  
entre nosotros, biológicamente,  
a la Tierra químicamente,  
al resto del Universo, atómicamente...”  
deGrasse Tyson

“¿Qué es la vida?  
Una ilusión,  
una sombra, una ficción,  
y el mayor bien es pequeño:  
que toda la vida es sueño,  
y los sueños, sueños son”  
Calderón de la Barca



## **Agradecimientos oficiales**

---

Esta tesis de doctorado 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 mis estudios de doctorado recibí una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número 480865, CVU 501169. Además conté con financiamiento del “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado” (PAEP) de la UNAM para la asistencia a congresos.

Este trabajo se realizó gracias a la subvención 214979 Ciencia de Frontera del CONACYT y las subvenciones IN226109 e IN216920 del PAPIIT.

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, UNAM
Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Liliana Quintanar Vera	CINVESTAV Zacatenco, IPN

A mis sinodales: Dr. Ismael Bustos Jaimes, Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, Dra. Alejandra Covarruvias, Dra. Rosario A. Muñoz Clares y Dr. Miguel Costas Basín, por la detallada revisión de mi trabajo y sus acertados comentarios que ayudaron a mejorarlo.

## **Agradecimientos a título personal**

---

Al Q.F.B. Sammy Israel Gutiérrez Terrazas por su ayuda a nivel práctico y teórico en el manejo del hongo *N. crassa*, así como su ayuda en la realización de algunos experimentos reportados en este trabajo. Además, agradezco su apoyo en la revisión detallada y sus comentarios sobre el artículo de revisión y en el presente manuscrito.

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

A la técnico académico la Dra. María Teresa Lara Ortiz y al Dr. Gabriel del Río Guerra por el apoyo prestado en el uso y manejo del lector de placas Synergy Mx.

A la Dra. Martha Contreras Zentella por su apoyo y consejos en la implementación de algunas técnicas y el uso de su espectrofotómetro Hitachi.

Al Dr. Leonardo Peraza Reyes y a su técnico académico el Dr. Fernando Suaste Olmos por prestarme su plásmido pUC/GFP empleado en la construcción de una de mis mutantes.

A la técnico académico la Dra. Nallely Cano Domínguez por sus consejos en el uso del hongo *N. crassa* así como por su atenta revisión de mi tesis.

A la Unidad de Biología Molecular, al taller de Mantenimiento y a la Unidad de Computo del IFC.

## **Agradecimientos personales**

---

A mi familia que me apoyaron durante todo mi desarrollo profesional y como persona.

A mis amigos que me han acompañado en todo este proceso, en especial a Sergio Gonzáles Mora por ser un fuerte apoyo y siempre recordarme por que decidí estudiar esta carrera al contagiarme siempre de su entusiasmo por la ciencia.

A mi amigo Fabián Vergara por su apoyo en los momentos difíciles y animarme a continuar avanzado.

A mis compañeros del laboratorio: Sammy, Mike, Vanessa, Marty, Isareli, Pablo, Uriel, Elena, Juan Pablo, Sra. Sarita Cruz, Sra. Laura, Clau y Omar por su apoyo incondicional y compañerismo en el laboratorio.

Al Dr. Wilhelm Hansberg por contribuir en mi formación no solo profesional sino también personal y servir como ejemplo de la tarea de un investigador y divulgador de la ciencia.

# Índice

---

<b>Lista de abreviaturas y acrónimos</b>	1
<b>Índice de figuras</b>	3
<b>Índice de tablas</b>	5
<b>Resumen</b>	6
<b>Introducción</b>	8
1. Las chaperonas moleculares	8
1.1. Las chaperonas dependientes del ATP	9
1.2. Las chaperonas independientes del ATP	9
2. Enzimas antioxidantes con actividad de chaperona	10
3. Las chaperonas de la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI	11
4. Las catalasas de subunidad grande	14
4.1. Las catalasas de subunidad grande del hongo <i>Neurospora crassa</i>	15
5. El dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande	16
<b>Antecedentes</b>	18
<b>Hipótesis</b>	21
<b>Objetivo general</b>	22
<b>Objetivos particulares</b>	22
<b>Metodología</b>	23
1. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	23
2. Plásmidos para la expresión de las proteínas en <i>E. coli</i>	24
3. Conservación, transformación de las bacterias y extracción del DNA plasmídico	25
4. Expresión y purificación de las diferentes proteínas	25
5. Enzimas comerciales	26
6. Ensayos de chaperona	26
6.1. Desnaturalización por calor	26

6.2. Desnaturalización con 8 M de urea	27
6.3. Desnaturalización por oxidación con peróxido de hidrógeno	27
7. Medición de las actividades enzimáticas	28
7.1. Actividad de la alcohol deshidrogenasa	28
7.2. Actividad de la citrato sintasa	28
7.3. Actividad de la $\beta$ -galactosidasa	28
7.4. Actividad de catalasa	29
8. Ensayo de recuperación de la actividad de la alcohol deshidrogenasa	29
9. Determinación de la presencia de zonas hidrofóbicas con la sonda bis-ANS	29
10. Inhibición de la actividad de chaperona con la sonda bis-ANS	30
11. Determinación de las interacciones electrostáticas mediante el aumento de la fuerza iónica	30
12. Determinación de las cavidades del dímero del dominio C-terminal de la catalasa-3 y predicción de los posibles sitios de interacción con otras proteínas	30
13. Construcción de CAT-3 <sup><math>\Delta</math>17aa</sup> y TDC3 <sup><math>\Delta</math>17aa</sup>	31
14. Ensayo de supervivencia de <i>E. coli</i>	31
14.1. Crecimiento de <i>E. coli</i> después de un estrés por calor	32
14.2. Crecimiento de <i>E. coli</i> después de un estrés oxidante	32
14.3. Crecimiento de <i>E. coli</i> en presencia del estrés osmótico	32
15. Cepas de <i>N. crassa</i>	33
16. Condiciones de crecimiento y conservación de las cepas de <i>N. crassa</i>	33
17. Cruzas sexuales en <i>N. crassa</i> y selección de las mutantes	34
18. Extracción del DNA del micelio de <i>N. crassa</i>	36

19. Construcciones de las proteínas con etiquetas fluorescentes	36
20. Transformación de conidios de <i>N. crassa</i> por electroporación	38
21. Determinación del fenotipo de las cepas del hongo <i>N. crassa</i>	39
21.1. Medición del crecimiento	39
21.2. Producción de conidios	40
21.3. Producción del micelio aéreo	40
21.4. Germinación de conidios en medio de colonia aislada	41
22. Determinación del tipo de dimerización del dominio C-terminal	41
23. Alineamiento estructural de la estructura cristalográfica del dominio C-terminal	41
<b>Resultados</b>	42
1. El dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande representa una nueva forma de dimerización de la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI	42
2. Caracterización de la actividad de chaperona <i>in vitro</i> del dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande	44
2.1. Expresión y purificación de las diferentes proteínas	44
2.2. Protección de la alcohol deshidrogenasa de la desnaturalización en presencia de una catalasa de subunidad grande o de su dominio C-terminal	45
2.2.1. Protección contra la desnaturalización por calor	46
2.2.2. Protección contra la desnaturalización por la presencia de 8 M de urea	47
2.2.3. Protección contra la desnaturalización por oxidación con peróxido de hidrógeno	48
2.3. El dominio C-terminal de la catalasa-3 protege al dominio catalítico y a la catalasa de bovino contra la desnaturalización	49
2.4. Las catalasas de subunidad grande y su dominio C-terminal ayudan a recuperar la actividad de la alcohol deshidrogenasa después de la desnaturalización	50

3. Determinación del mecanismo de acción de la actividad de chaperona de las catalasas de subunidad grande	51
3.1. Importancia de las zonas hidrofóbicas en la superficie de la proteína para la actividad de chaperona de las catalasas de subunidad grande	52
3.2. Importancia de las interacciones electrostáticas en la actividad de chaperona de las catalasas de subunidad grande	55
3.3. Determinación de la zona de interacción con las proteínas parcialmente desnaturalizadas	57
3.3.1. Predicción de las zonas de interacción	57
3.3.2. Pérdida de la actividad de chaperona con la eliminación de los últimos 17 aminoácidos del extremo carboxilo del dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande	58
4. Determinación de la función <i>in vivo</i> de la actividad de chaperona del dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande	59
4.1. La sobreexpresión de la catalasa-3 o de su dominio C-terminal contribuye a la supervivencia de <i>E. coli</i> ante diferentes condiciones de estrés	59
4.1.1. Crecimiento de <i>E. coli</i> después de un estrés por calor	60
4.1.2. Crecimiento de <i>E. coli</i> después de un estrés oxidante	61
4.1.3. Crecimiento de <i>E. coli</i> en estrés osmótico	62
4.2. La función fisiológica de la actividad de chaperona del dominio C-terminal de la catalasa-3 en el hongo <i>N. crassa</i>	63
4.2.1. Separación de los dos dominios de actividad, de catalasa y de chaperona, de la catalasa-3 etiquetados con proteínas fluorescentes	63
4.2.2. Fenotipo de las mutantes	66
4.2.2.1. Caracterización del fenotipo de las cepas en condiciones sin estrés	66
4.2.2.2. Caracterización de las cepas en condiciones de estrés por calor	71
4.2.2.3. Caracterización de las cepas en condiciones de estrés oxidante	74
<b>Discusión</b>	76

<b>Conclusiones</b>	81
<b>Perspectivas</b>	82
<b>Referencias</b>	83
<b>Apéndice I. Material suplementario</b>	93
<b>Apéndice II. Artículo experimental</b>	100
<b>Apéndice III. Artículo de revisión</b>	108



## Lista de abreviaturas y acrónimos

---

aa	Aminoácido
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ATP	Trifosfato de adenosina
bis-ANS	4,4'-dianilino-1,1'-binaftilo-5,5'-ácido disulfónico (1,1'- <u>B</u> is( <u>a</u> nilino)-4-,4'-bis( <u>n</u> aphtalene)-8,8'-disulfonate)
BSA	Albúmina de suero bovino ( <u>B</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin)
C63	Catalasa-1 de <i>N. crassa</i> sin el dominio C-terminal ni 14 aminoácidos del extremo N-terminal
CAT-1	Catalasa-1 de <i>N. crassa</i>
CAT-3	Catalasa-3 de <i>N. crassa</i>
CAT-3 <sup>Δ17aa</sup>	Catalasa-3 sin los últimos 17 aminoácidos
CAT-3 <sup>ΔTD</sup>	Dominio catalítico de la CAT-3 (CAT-3 sin el dominio C-terminal)
CAT-3 <sup>ΔTD/GFP</sup>	Catalasa-3 sin el dominio C-terminal etiquetada en el extremo carboxilo con la proteína GFP
CAT-A	Catalasa de subunidad pequeña de <i>A. niger</i>
CAT-Bov	Catalasa de hígado de bovino
CAT-R	Catalasa de subunidad grande de <i>Aspergillus niger</i>
CS	Citrato sintasa
C-terminal	Carboxilo terminal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERO	Especies reactivas del oxígeno
HSP	Proteína del choque térmico ( <u>H</u> eat <u>s</u> hock protein)
Hsp31	Proteína de choque de calor, de 31 kDa, de <i>E. coli</i>
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
LSC	Catalasas de subunidad grande ( <u>L</u> arge-size <u>s</u> ubunit <u>c</u> atalases)
mCherry/TDC3	Dominio C-terminal de la catalasa-3 etiquetado en el extremo amino con la proteína mCherry
MCS	Sitio de clonado múltiple ( <u>M</u> utli <u>c</u> lonig <u>s</u> ite)

NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina ( <u>N</u> icotin <u>a</u> denin <u>d</u> inucleotide)
OAA	Ácido oxalacético ( <u>O</u> xalo <u>a</u> cetic <u>a</u> cid)
OD <sub>600</sub>	Densidad óptica a 600 nm ( <u>O</u> ptical <u>d</u> ensity)
ONPG	o-nitrofenil-D-galactopiranosido ( <u>o</u> rho- <u>N</u> itrophenyl-β-galactoside)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PDB	<u>P</u> rotein <u>D</u> ata <u>B</u> ank
PVC	Catalasa de subunidad grande de <i>Penicillium vitale</i>
RMSD	Desviación cuadrática media ( <u>R</u> oot- <u>m</u> ean- <u>s</u> quare <u>d</u> eviation)
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico ( <u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulphate)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida ( <u>P</u> oly <u>a</u> crylamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis)
SSC	Catalasas de subunidad pequeña ( <u>S</u> mall-size <u>s</u> ubunit <u>c</u> atalases)
TDC3	Dominio C-terminal de la CAT-3
TDC3 <sup>Δ17aa</sup>	Dominio C-terminal de la CAT-3 sin los últimos 17 aminoácidos
u. a.	Unidades arbitrarias
UV	Luz ultravioleta
VS	Medio Vogel con sacarosa
WT	Silvestre
β-gal	β-galactosidasa

## Índice de figuras

---

Figura 1. Mecanismo de acción de la chaperona Hsp31 de <i>E. coli</i>	13
Figura 2. Comparación entre la estructura del monómero y del tetrámero de una SSC y una LSC	14
Figura 3. Estabilidad de la CAT-1 y la C63 a 93 °C.	18
Figura 4. Alineamiento de la estructura cristalográfica del dominio C-terminal de la CAT-1, la CAT-3 y dos miembros de la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI.	19
Figura 5. Dependencia de la concentración de las LSC para proteger la ADH de la desnaturalización a 45 °C.	20
Figura 6. Tipos de dimerización de los miembros de la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI	43
Figura 7. Separación por electroforesis de las proteínas expresadas en <i>E. coli</i> y purificadas por afinidad al Ni de la etiqueta 6xHis y de la CAT-1 purificada de <i>N. crassa</i>	45
Figura 8. Protección de la ADH contra la desnaturalización a 45 °C	47
Figura 9. Protección de la ADH contra la desnaturalización con 8 M de urea	48
Figura 10. Protección de la ADH contra la desnaturalización por oxidación con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	49
Figura 11. Protección de la CAT-Bov y la CAT-3 <sup>ΔTD</sup> de la desnaturalización con calor en presencia del dominio TDC3	50
Figura 12. Ensayo de recuperación de la actividad de ADH	51
Figura 13. Fluorescencia de la sonda bis-ANS cuando se une a las zonas hidrofóbicas que se exponen en la superficie de la proteína	53
Figura 14. Inhibición de la actividad de chaperona por foto-incorporación de la sonda bis-ANS	54
Figura 15. El TDC3 y la sonda bis-ANS interaccionan con la misma zona de la ADH parcialmente desnaturalizada	55
Figura 16. El aumento en la fuerza iónica del medio afecta la actividad de chaperona de la CAT-3 y del dominio TDC3	56

Figura 17. Predicción de las cavidades y de la posible zona de interacción del dominio TDC3 con otras proteínas	57
Figura 18. Separación por electroforesis de las proteínas sin los últimos 17 aminoácidos, expresadas en <i>E. coli</i>	58
Figura 19. La CAT-3 sin los últimos 17 aminoácidos pierde su actividad de chaperona	59
Figura 20. Crecimiento de <i>E. coli</i> después de un estrés por calor cuando expresa una chaperona	60
Figura 21. Crecimiento de <i>E. coli</i> después de un estrés oxidante cuando expresa una chaperona	62
Figura 22. Crecimiento de <i>E. coli</i> durante un estrés osmótico cuando expresa una chaperona	63
Figura 23. Construcciones para etiquetar los dos dominios de la CAT-3 con proteínas fluorescentes y la comprobación de las cepas por PCR	65
Figura 24. Crecimiento de las diferentes cepas en condiciones sin estrés	67
Figura 25. Conidiación de las diferentes cepas	69
Figura 26. Producción del micelio aéreo de las diferentes cepas	70
Figura 27. Porcentaje de germinación de las diferentes cepas	71
Figura 28. Crecimiento de las diferentes cepas a 42 °C	73
Figura 29. Crecimiento de las diferentes cepas en estrés oxidante con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	75
Figura 30. Alineamiento estructural y aminoácidos conservados en el dominio C-terminal de las LSC	78

## Índice de tablas

---

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos empleados para la generación de los plásmidos de expresión en *E. coli*. 24

Tabla 2. Oligonucleótidos específicos empleados para la generación de la construcción para etiquetar los dominios de la CAT-3 y transformarlos en *N. crassa*. 37

## Resumen

---

Las chaperonas moleculares son proteínas que interactúan con proteínas que no tienen un plegamiento nativo y ayudan a recuperar su conformación nativa. La mayoría de las proteínas son metaestables y pueden adquirir distintas conformaciones o desnaturalizarse parcialmente, por lo que las chaperonas son esenciales para mantener a las proteínas funcionales dentro de las células. Además evitan la agregación de las proteínas en condiciones con o sin estrés (Hartl *et al.*, 2011). A pesar de su gran diversidad, las chaperonas exhiben algunas características comunes como: su presencia en diferentes compartimentos celulares así como en el medio extracelular, su expresión en condiciones sin estrés pero sobre todo durante el estrés, su abundancia y gran capacidad para interactuar con diversas proteínas sin que la interacción dependa de dominios o secuencias específicas (Hartl *et al.*, 2011; Nava Ramírez & Hansberg, 2020a). Una de las formas de clasificar las chaperonas es según su requerimiento energético: las que dependen del ATP y las independientes del ATP (Hiller & Burmann, 2018; Suss & Reichmann, 2015). En este último grupo se han identificado algunas proteínas de la respuesta antioxidante de las células que tienen actividad de chaperona además de su actividad catalítica, como son las peroxirredoxinas, las tiorredoxinas y las disulfuro isomerasas (Goemans *et al.*, 2018; Jang *et al.*, 2004; Kern *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2015).

En el presente trabajo se describe que las catalasas de subunidad grande también tienen actividad de chaperona (Nava-Ramírez, 2017; Nava-Ramírez & Hansberg, 2020b). Esta actividad de chaperona radica en el dominio carboxilo-terminal (C-terminal) que tiene una estructura parecida a la chaperona DJ-1, razón por la cual se ha incluido en la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI. Al igual que otras chaperonas, las catalasas de subunidad grande son proteínas abundantes en la célula y se inducen en diferentes condiciones de estrés.

Se evaluó la actividad de chaperona del dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande, principalmente de la CAT-3 del hongo *Neurospora crassa*, en condiciones *in vitro* e *in vivo*, demostrando que protege a otras proteínas de la desnaturalización por calor, por 8 M de urea o por oxidación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta actividad se comparó con la de Hsp31, que es ortólogo de DJ-1. El C-terminal de estas catalasas y la Hsp31 ayudan a recuperar la

conformación nativa de una proteína después de su desnaturalización. Además, se evaluó el mecanismo de acción de la actividad de chaperona del dominio C-terminal, evidenciando que depende de interacciones de tipo hidrofóbicas y electrostáticas. También se determinó que la función de chaperona de la CAT-3 y su dominio C-terminal ayudan a aumentar la supervivencia de *Escherichia coli* en condiciones de estrés oxidante o por calor. Por último, en mutantes de *N. crassa*, la deficiencia del dominio C-terminal de la CAT-3 afecta la velocidad de crecimiento del hongo, así como la germinación y la conidiación.

## Introducción

---

### 1. Las chaperonas moleculares

El citosol es una matriz fluida compuesta por cientos de sustancias disueltas en agua que contiene alrededor de 400 mg/mL de macromoléculas en constante movimiento (*Hartl et al.*, 2011; Koldewey *et al.*, 2017; Zimmerman & Trach, 1991). Con esta concentración en el citosol, la gran cantidad de interacciones que continuamente ocurren entre macromoléculas favorecen la realización de las funciones celulares, pero también pueden producir conformaciones alternativas a la estructura nativa de las proteínas, que son inactivas y se pueden agregar (Ellis & Minton, 2006; Hall, 2020; Hartl *et al.*, 2011).

Otras causas de la pérdida de la estructura nativa de las proteínas son las mutaciones, los defectos en la biogénesis de las mismas (como los errores en la traducción), el estrés medioambiental (como es el estrés oxidante o el estrés por calor) y la agregación que se genera con el envejecimiento celular. Las proteínas que han perdido la conformación nativa suelen formar agregados, los cuales pueden causar perturbaciones en la actividad de las células (Ellis & Minton, 2006; Hartl *et al.*, 2011).

Las chaperonas moleculares se pueden definir como proteínas que se une a proteínas que tienen un plegamiento no nativo y al interactuar con ellas las estabilizan, y en algunos casos les permite recuperar su conformación nativa. Son esenciales para las células debido a que mantienen las proteínas en su conformación funcional y además evitan que las proteínas mal plegadas se agreguen, particularmente en condiciones de estrés. También participan en diversos procesos celulares, como en el plegamiento *de novo* de las proteínas durante la traducción, en el transporte de proteínas, y durante la degradación de proteínas, siendo una pieza clave en la homeostasis celular. Además, reducen el efecto de las mutaciones que causan agregación de proteínas (Hartl *et al.*, 2011; Hartl & Hayer-Hartl, 2009).

En la actualidad se conocen múltiples proteínas con función de chaperona, las cuales exhiben una gran diversidad de estructuras y comparten algunas características comunes: están presentes en diferentes compartimentos celulares así como en el medio extracelular, son abundantes, tienen una gran capacidad para interactuar con diversas proteínas sin que



la interacción dependa de dominios o secuencias específicas y se expresan durante el estrés o según el proceso celular en el que participan (Hartl *et al.*, 2011; Nava-Ramírez & Hansberg, 2020a). La mayoría de las chaperonas moleculares participan en procesos celulares específicos (Saibil, 2013).

Hay diferentes maneras de clasificar las chaperonas moleculares, aunque el requerimiento energético las cataloga mejor, pues permite una mejor comprensión de sus mecanismos de acción. Según esto, las chaperonas se dividen en dos grandes grupos: las que dependen del ATP y las independientes del ATP (Hiller & Burmann, 2018; Suss & Reichmann, 2015).

### **1.1. Las chaperonas dependientes del ATP**

Las chaperonas dependientes del ATP suelen ser de alto peso molecular y formar complejos para realizar la actividad de chaperona, además de emplear ciclos de hidrólisis de ATP junto con amplios cambios conformacionales para reconocer, plegar y liberar las proteínas sustrato (Hiller & Burmann, 2018; Nava-Ramírez & Hansberg, 2020a). Los ejemplos más estudiados son Hsp60 (GroEL/ES), Hsp70/Hsp110 (DnaK), Hsp104 (ClpB), y Hsp90 (HtpG) (Hartl *et al.*, 2011; Hiller & Burmann, 2018).

### **1.2. Las chaperonas independientes del ATP**

Las chaperonas independientes del ATP son un grupo diverso y ubicuo de proteínas, generalmente de bajo masa molecular (12 - 43 kDa) (Jaspard & Hunault, 2016). Estas chaperonas protegen a otras proteínas de la desnaturalización evitando la agregación, y en algunos casos, ayudan a recuperar la estructura nativa de las proteínas desnaturalizadas sin recurrir a un gasto energético. Se ha reportado para muchas de estas chaperonas que tienen otra función además de su actividad de chaperona, generalmente una actividad enzimática, como ejemplo, de proteasa o de isomerasas (Hall, 2020; Nava-Ramírez & Hansberg, 2020a; Suss & Reichmann, 2015).

Las chaperonas de bajo peso molecular se han empleado como un buen modelo de estudio para entender su mecanismo de acción y la forma en la que interaccionan con las proteínas desdobladas. Una de las proteínas más estudiadas es la chaperona bacteriana Spy. Su mecanismo de acción se basa principalmente en la unión de superficies hidrófobas flexibles

con las superficies hidrófobas expuestas de la proteína desdoblada, junto con interacciones de alta afinidad, como interacciones electrostáticas (Hiller & Burmann, 2018; Koldewey *et al.*, 2016). El mecanismo de acción de las chaperonas independientes del ATP es similar al de Spy, aunque puede variar un poco en qué tipo de interacción participa más (Webster *et al.*, 2019).

## **2. Enzimas antioxidantes con actividad de chaperona**

En la actualidad se sabe que algunas proteínas que participan en la respuesta antioxidante de las células tienen actividad de chaperona, además de su actividad catalítica. Protegen a la célula de la desnaturalización y de la agregación de proteínas mal conformadas y lo hacen de manera independiente del ATP. Las enzimas antioxidantes que tienen actividad de chaperona conocidas hasta ahora son: las peroxirredoxinas, las tiorredoxinas y las disulfuro isomerasas (Goemans *et al.*, 2018; Jang *et al.*, 2004; Kern *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2015).

Las peroxirredoxinas de dos cisteínas previenen la desnaturalización de otras proteínas durante condiciones de estrés oxidante o por calor, evitando la agregación (Jang *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2015). La actividad de chaperona de estas peroxirredoxinas depende del estado de oxidación. Cuando se encuentra reducida la cisteína del sitio activo, su actividad de chaperona es muy baja y se encuentra principalmente como monómero; esto también se observa en la conformación dimerica cuando las cisteínas de su sitio activo forman puentes disulfuro. Cuando esta como monómero o dímero llevan a cabo la actividad de peroxidasa. En cambio, cuando la cisteína del sitio activo se hiperoxida a ácido sulfínico ( $-SO_2H$ ) o sulfónico ( $-SO_3H$ ), los dímeros hiperoxidados forman decámeros o dodecámeros. En estas conformaciones pierden la actividad de peroxidasa y la actividad de chaperona se incrementa considerablemente. Estas peroxirredoxinas pueden regresar a la forma monomérica o dimerica cuando la cisteína hiperoxidada del sitio activo se reduce, el grupo de ácido sulfínico se puede reducir mediante la sulfirredoxina reductasa de ácido sulfínico; en cambio, en cambio, la formación del ácido sulfónico es irreversible (Barranco-Medina *et al.*, 2009; Zeida *et al.*, 2020).

Las tiorredoxinas con actividad de chaperona evitan la desnaturalización y agregación de otras proteínas, además de que ayudan a recuperar la estructura nativa de las proteínas

parcialmente desdobladas en condiciones de estrés oxidante o por calor. Las tiorredoxinas tienen un motivo denominado Trx, mediante el cual interaccionan con las proteínas desnaturalizadas (Du *et al.*, 2015; Kern *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2009). Su actividad de chaperona depende del estado de oligomerización: al aumentar la temperatura en la célula se forman oligómeros, como hexámeros o multímeros mayores, con lo cual aumenta considerablemente la actividad de chaperona, pero pierden su actividad enzimática; esta conformación es reversible cuando disminuye la temperatura. En cambio, en la forma monomérica tienen principalmente actividad de reductasa de disulfuro y la actividad de chaperona está disminuida (Lee *et al.*, 2009).

Las disulfuro isomerasas tienen actividad de chaperona ya que evitan la desnaturalización de otras proteínas, además de ayudar al correcto plegamiento con la formación de puentes disulfuro, lo cual ocurre en el retículo endoplásmico en eucariontes y en el periplasma en bacterias (Shao *et al.*, 2000; Tsai *et al.*, 2001; Wang, 2002; Wilson *et al.*, 1998). La actividad de chaperona de estas enzimas es a través de su interacción con las proteínas desdobladas que tienen un dominio b'. Esta interacción está regulada por el estado redox de las disulfuro isomerasas, ya que la asociación con las proteínas sustrato requiere la disociación del disulfuro de su sitio activo (Lumb & Bulleid, 2002; Tsai *et al.*, 2001).

Recientemente hemos descrito que las catalasas de subunidad grande (LSC) también tienen actividad de chaperona, evitando la desnaturalización de otras proteínas y ayudando a recuperar la conformación nativa de las proteína sustrato (Nava-Ramírez, 2017; Nava-Ramírez & Hansberg, 2020b). La actividad de chaperona se debe al dominio carboxilo-terminal, el cual tiene una estructura parecida a la de la chaperona DJ-1, por lo que este dominio ha sido incluido en la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI.

### **3. Las chaperonas de la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI**

La superfamilia de proteínas DJ-1/ThiJ/PfpI es muy diversa y está presente en los tres dominios de la vida (Bandyopadhyay & Cookson, 2004). Las proteínas de esta superfamilia se caracterizan por tener un dominio DJ-1 o ThiJ, con plegamiento tipo Rossmann, caracterizado por un arreglo de hebras beta paralelas unidas por hélices alfa, elementos dispuestos generalmente en dos unidades beta-alfa-beta (Wei *et al.*, 2007). Estas proteínas

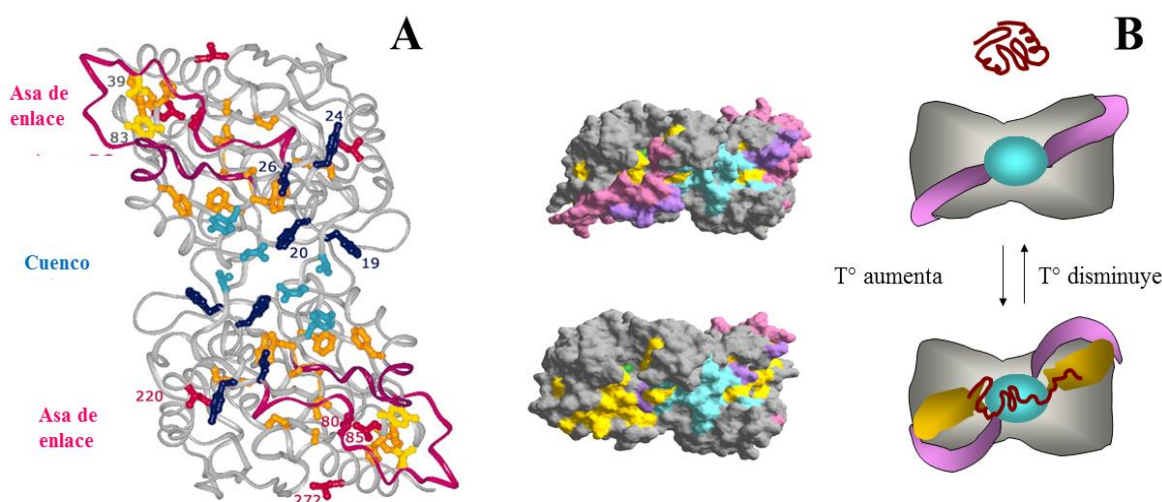
cuentan con una triada catalítica Cys-His-Glu/Asp en medio del dominio DJ-1; sin embargo, no todos los miembros de la superfamilia tienen la triada catalítica completa (Horvath & Grishin, 2001; Lucas & Marín, 2007).

En esta superfamilia existen proteínas con actividad de chaperona, siendo las más estudiadas la DJ-1 humana y la Hsp31 de *E. coli*. Una característica común de las chaperonas de esta superfamilia es que tienen una estructura cuaternaria de dímero. Los dímeros se pueden clasificar según la forma en la que se unen los monómeros en el dímero, que puede estar relacionado con la manera en la que interaccionan con las proteínas mal plegadas (Jung *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2007).

La DJ-1 de humano evita la agregación de proteínas *in vitro* e *in vivo*. Ha sido muy estudiada por estar relacionada con enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer, padecimientos en los que ciertas mutaciones en DJ-1 que tienen disminuida la función de chaperona favorecen la agregación de algunas proteínas en el cerebro, como la  $\alpha$ -sinucleína (Alvarez-Castelao *et al.*, 2012; Dolgacheva *et al.*, 2019). Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de la actividad de chaperona, está relacionada con el estado redox, ya que la oxidación de la cisteína conservada en el sitio activo aumenta significativamente esta actividad y le confiere la capacidad de desagregasa, favoreciendo la eliminación de las fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína (Shendelman *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2006). Además, la región hidrofóbica de la DJ-1 humana (Val-146, Phe-162, Leu-166, Ala-167, Ala-178 y Leu-187) es posiblemente el sitio de interacción con las proteínas desdobladas (Lee *et al.*, 2003).

La Hsp31 de *E. coli* es una proteína homodimérica que evita la agregación de proteínas *in vitro* e *in vivo*, además de ayudar a recuperar el plegamiento funcional de las proteínas después de la desnaturalización con calor o agentes químicos (Kim *et al.*, 2018; Malki *et al.*, 2003; Sastry *et al.*, 2002). La actividad de chaperona depende principalmente de las interacciones transitorias de tipo hidrofóbico y electrostático de algunos aminoácidos con carga (Quigley *et al.*, 2004; Sastry *et al.*, 2004). Aunque la zona de unión con las proteínas desnaturalizadas aún no se ha identificado, se ha descrito una región hidrofóbica en la superficie, en el sitio denominado “cuenco” (Ala-14, Pro-21, Leu-26, Met-101, Tyr-106, Met-109 y Phe-120 de cada monómero), localizado en la interfaz de las dos subunidades

del dímero, la cual posiblemente interacciona con las proteínas desnaturalizadas (Lee *et al.*, 2003). Cuando se mutan los aminoácidos hidrofóbicos de la zona del cuenco del dominio A y del asa de enlace hay una reducción de la actividad de chaperona, lo que sugiere que la superficie hidrofóbica dentro del cuenco es donde ocurre la interacción con las proteínas desnaturalizadas. El asa de enlace normalmente cubre esta zona entre las dos subunidades del dímero. Al aumentar la temperatura ( $> 45^{\circ}\text{C}$ ) se produce un cambio conformacional que flexibiliza el asa y permite la exposición de la región hidrofóbica en el cuenco favoreciendo así la unión con la proteína sustrato, la cual al recuperar su estructura nativa se libera de la chaperona al reducirse las interacciones hidrofóbicas entre ambas. Al disminuir la temperatura el asa pierde la flexibilidad y regresa a una conformación cerrada (Quigley *et al.*, 2004; Sastry *et al.*, 2004) (Figura 1).

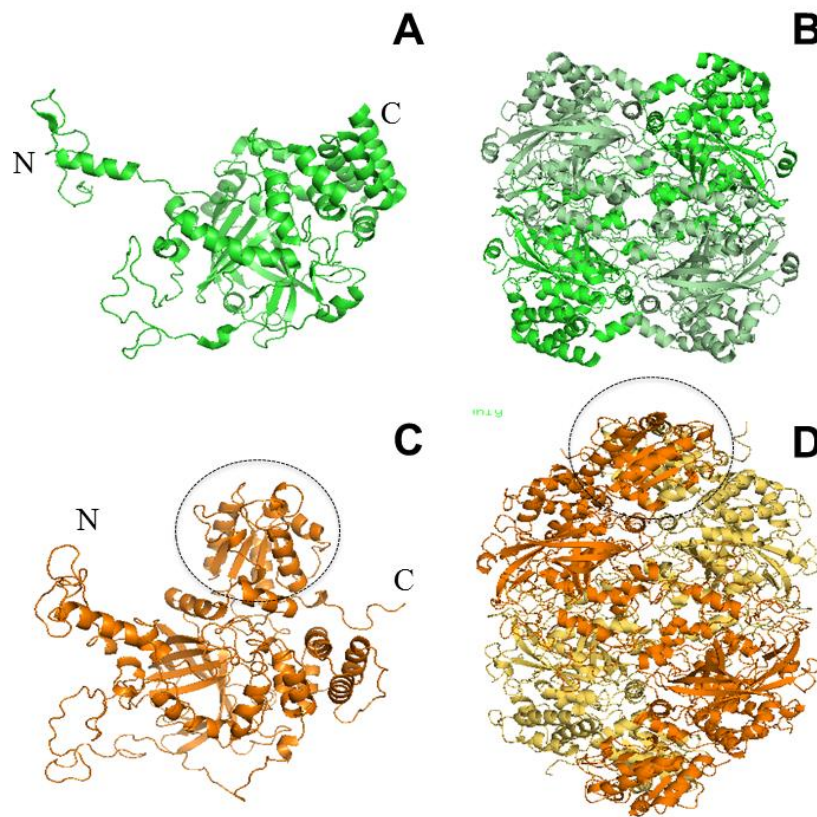


**Figura 1. Mecanismo de acción de la chaperona Hsp31 de *E. coli*.** A) Estructura cristalográfica del dímero de la Hsp31 de *E. coli* representada en lasos. En rosa se marca el asa de enlace entre las dos subunidades del dímero, en azul claro y oscuro los aminoácidos hidrofóbicos de la región del cuenco que participan en la interacción con las proteínas sustrato. B) Esquema representativo del mecanismo de acción de la actividad de chaperona de Hsp31 de *E. coli*: a temperatura ambiente (paneles superiores) el asa de enlace (en rosa) se encuentra en conformación cerrada, obstruyendo la zona de interacción del cuenco (azul), al aumentar la temperatura (paneles inferiores) el asa de enlace se flexibiliza adoptando una

conformación abierta y exponiendo la zona del cuenco, lo cual favorece la interacción con la proteína sustrato. Imagen modificada de Sastry *et al.*, 2004.

#### 4. Las catalasas de subunidad grande

Las hemo-catalasas monofuncionales son enzimas que degradan el  $H_2O_2$  y lo convierten en dioxígeno y agua. Se clasifican en dos grandes grupos: las de subunidad pequeña (SSC) (con una masa aproximada del monómero de 60 kDa) y las de subunidad grande (LSC) (con una masa del monómero entre 79 a 84 kDa) que tienen un dominio C-terminal adicional de 100 a 190 aminoácidos (Díaz *et al.*, 2005). Las SSC son ubicuas y se encuentran representadas en casi todos los organismos, mientras que las LSC se encuentran en bacterias, hongos y en algunas arqueas (Wilhelm Hansberg *et al.*, 2012; Zámocký *et al.*, 2012) (Figura 2).



**Figura 2. Comparación entre la estructura del monómero y del tetrámero de una SSC y una LSC. A) Monómero de la SSC del eritrocito humano. B)**

Tetrámero de la SSC del eritrocito humano. C) Monómero de la CAT-3 de *N. crassa*. D) Tetrámero de la CAT-3 de *N. crassa*.

Las LSC son proteínas muy resistentes que se activan con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta concentraciones molares (Díaz *et al.*, 2001). Son resistentes a la desnaturalización con calor, agentes químicos (como la urea y la guanidina) y al corte con proteasas (Chelikani *et al.*, 2003; Díaz *et al.*, 2001). Tienen una temperatura óptima de actividad entre los 50 y los 60 °C (Díaz *et al.*, 2001, 2005).

Las LSC son proteínas abundantes en la célula y se expresan en diferentes condiciones de estrés. Durante el estrés oxidante y el estrés por calor aumenta considerablemente la actividad de catalasa en *N. crassa*, *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus nidulans* (Michán *et al.*, 2002; Noventa-Jordão *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2017). Además, se ha visto que son necesarias para que las germínulas de *A. nidulans* se recuperen de un choque de calor (Noventa-Jordão *et al.*, 1999). En los hongos fitopatógenos, las LSC son importantes para contender con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por la planta durante el proceso de infección. En el hongo *Magnaporthe grisea*, la deficiencia de la LSC disminuye la capacidad de infección del hongo y reduce la supervivencia durante el estrés oxidante, además de mostrar un crecimiento acelerado con poca biomasa, una disminución en la producción de conidios y de producir conidios y apresorios frágiles (Skamnioti *et al.*, 2007).

#### **4.1. Las catalasas de subunidad grande del hongo *Neurospora crassa***

*N. crassa* cuenta con dos catalasas de subunidad grande, CAT-1 y CAT-3, las cuales son proteínas homotetraméricas codificadas por los genes *cat-1* y *cat-3*, respectivamente (Michán *et al.*, 2002). La CAT-1 se encuentra principalmente en el citosol, pero también se ha visto asociada con la pared celular del hongo, aunque no cuenta con un péptido de secreción, y asimismo se ha visto presente en la mitocondria y en el núcleo (Montes de Oca, 1999). Esta proteína se asocia con las células que no crecen, como por ejemplo, las hifas de la fase de crecimiento estacionario y principalmente los conidios, en los que la CAT-1 representa el 0.6% de la proteína total (Michán *et al.*, 2002). La mutante nula del gen *cat-1*,  $\Delta cat-1$ , tiene afectada la germinación de los conidios (Michán *et al.*, 2003).

La CAT-3 se asocia principalmente con la pared celular y es secretada parcialmente al medio extracelular, ya que tiene un péptido señal de secreción en el extremo N-terminal y está glicosilada con N-acetil-glucosamina, aunque también se ha visto localizada en el citosol (Díaz *et al.*, 2001, 2009; Montes de Oca, 1999; Patel & Free, 2019; Schliebs *et al.*, 2006). Esta enzima se induce al inicio del proceso de conidiación, durante la fase de crecimiento pre-estacionario y aumenta durante el crecimiento exponencial, particularmente en condiciones de estrés, como el estrés oxidante y por calor, y con la privación de nutrientes, como de la fuente de nitrógeno (Michán *et al.*, 2002). La mutante nula del gen *cat-3*,  $\Delta cat-3$ , muestra una disminución en la actividad total de catalasa en el hongo, lo que genera un incremento en la tensión oxidante intracelular, que a su vez da lugar a un aumento en la formación del micelio aéreo y de los conidios en comparación con la cepa silvestre (WT) (Michán *et al.*, 2003) (descripción del ciclo de vida y sistema modelo en Apéndice I.1).

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

Las LSC tienen una región altamente conservada a nivel estructural y de secuencia, correspondiente al dominio catalítico, y dos regiones variables poco conservadas a nivel de secuencia, el extremo N-terminal y el dominio C-terminal. Sin embargo, este último mantiene una estructura muy conservada (Hansberg *et al.*, 2012). El dominio C-terminal tiene una estructura similar a la de la flavodoxina, con un plegamiento tipo Rossmann (Sevinc *et al.*, 1998).

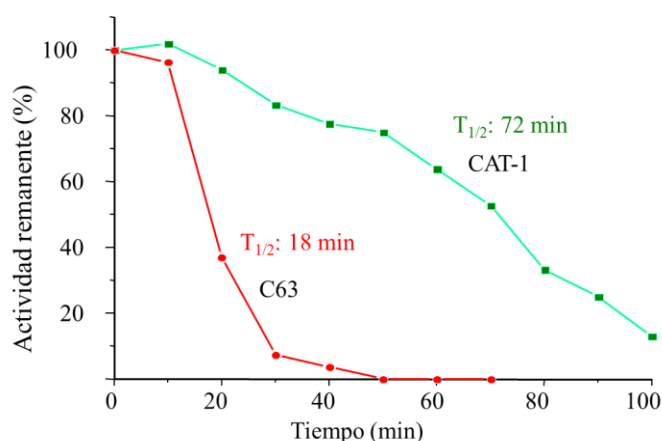
La pérdida del dominio C-terminal conlleva a la pérdida de la estabilidad de las LSC. Cuando se elimina el dominio C-terminal de la HP11 de *E. coli*, la enzima genera plegamientos inadecuados, volviéndola inestable, que abaten la actividad de catalasa, y que favorecen su agregación (Sevinc *et al.*, 1998). También, en una cepa de *Staphylococcus aureus* (aislada de una muestra clínica), la cual tiene una catalasa KatA sin el dominio C-terminal, se observó que presenta una reducción de la actividad de catalasa *in vivo*, esto es debido a que la KatA trunca es menos estable que la catalasa WT, favoreciéndose la agregación de la enzima trunca en condiciones no estresantes y ocasionando una reducción del 60% de la supervivencia de la bacteria ante un estrés oxidante (Teo *et al.*, 2015).



La pérdida del dominio C-terminal también afecta la estabilidad de las LSC en condiciones *in vitro*. Por ejemplo, en la HPII la pérdida de este dominio por el corte con una proteasa disminuye la temperatura de disociación del dímero a 80 °C, cuando en la proteína completa la disociación empieza a partir de los 95 °C. Además, la variante trunca pierde la actividad al incubarse a 59 °C, mientras que la proteína completa lo hace a 85 °C (Chelikani *et al.*, 2003).

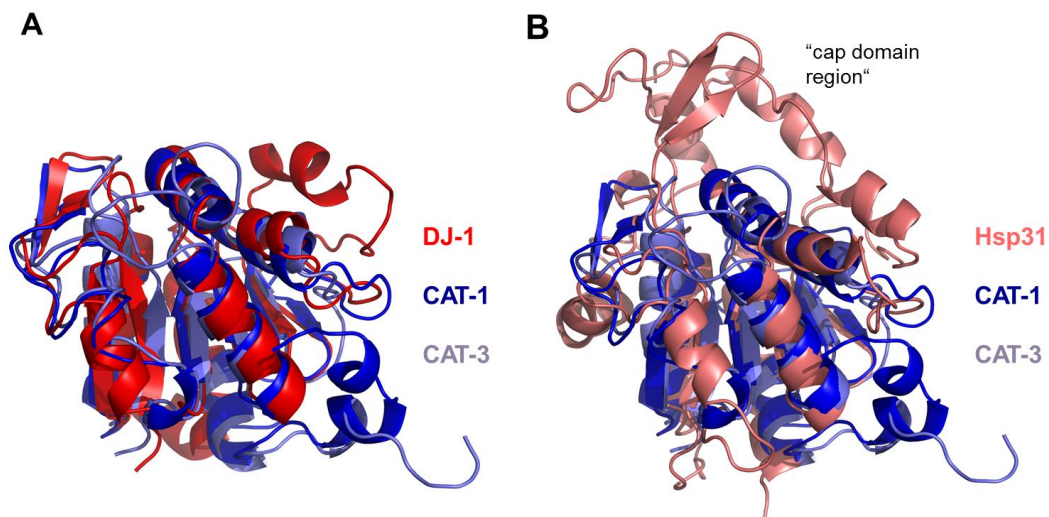
## Antecedentes

El laboratorio del Dr. Hansberg reportó que las LSC de *N. crassa* presentan una gran estabilidad ante agentes desnaturizantes como altas concentraciones de urea o de guanidina (Díaz, *et al.*, 2009). Al eliminar el dominio C-terminal de la CAT-1 mediante el corte de una proteasa no se pierde la actividad de catalasa (denominada C63), pero sí la estabilidad de la CAT-1. Al incubar a 93 °C, se observó que la CAT-1 completa pierde su actividad de manera paulatina con una disminución del 50% después de 72 minutos de incubación, mientras que con la C63 esto ocurre a los 18 minutos (Rangel y Hansberg, datos no publicados) (Figura 3).



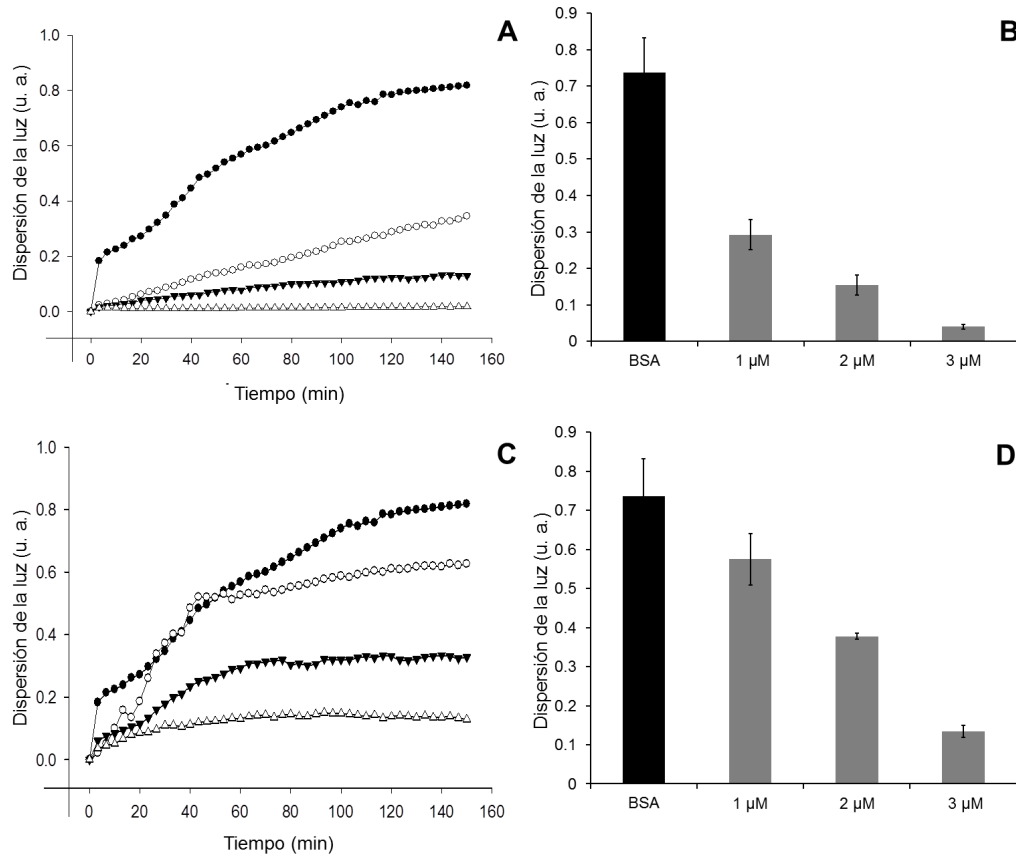
**Figura 3. Estabilidad de la CAT-1 y la C63 a 93 °C.** Actividad remanente de la CAT-1 o de la C63 cuando se incuban a 93 °C por diferentes tiempos (Rangel y Hansberg, datos no publicados).

Durante mis estudios de maestría se determinó que el dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande de *N. crassa* tienen una estructura muy similar a la DJ-1 humana y la Hsp31 de *E. coli*. A nivel de alineamiento de las secuencias su semejanza es baja (ver Apéndice I) mientras que en un alineamiento estructural se observa que en ambos casos hay una gran similitud estructural lo cual se muestra por los valores de RMSD del alineamiento (Figura 4) (valores del alineamiento en el Apéndice I.2).



**Figura 4. Alineamiento de la estructura cristalográfica del dominio C-terminal de la CAT-1, la CAT-3 y dos miembros de la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI.** A) Entre el dominio C-terminal de la CAT-1, la CAT-3 y la Hsp31 de E. coli. B) Entre el dominio C-terminal de la CAT-1, la CAT-3 y la DJ-1 de humano.

Se observó que la CAT-1, la CAT-3 y el dominio C-terminal de la CAT-3 (C50) (obtenido mediante la digestión de la CAT-3 con trombina) presentan actividad de chaperona *in vitro*, ya que evitan la desnaturalización de otras proteínas con una temperatura alta o en presencia de 8 M de urea. Esta actividad depende de la concentración de estas proteínas (Figura 5).



**Figura 5. Dependencia de la concentración de las LSC para proteger la ADH de la desnaturalización a 45 °C.** A) Dispersión de la luz (u. a.) generada por la desnaturalización de la ADH 6 μM al ser incubada a 45 °C en presencia de BSA 6 μM como control (círculos rellenos) o de la CAT-3 a diferentes concentraciones: 1 μM (círculos vacíos), 2 μM (triángulos rellenos) y 3 μM (triángulos vacíos). B) Promedio del valor final de dispersión de la luz de tres experimentos independientes. C) Dispersión de la luz (u. a.) generada por la desnaturalización de la ADH 6 μM en presencia de BSA 6 μM como control (círculos rellenos) o de la CAT-1 a diferentes concentraciones: 1 μM (círculos vacíos), 2 μM (triángulos rellenos) y 3 μM (triángulos vacíos). D) Promedio del valor final de dispersión de la luz de tres experimentos independientes.

Para completar la caracterización de la actividad de chaperona se incluyeron nuevos controles a los ensayos *in vitro*. En el presente trabajo se determinó el mecanismo de acción de la actividad de chaperona del dominio C-terminal y su función *in vivo*.

## Hipótesis

---

- 1) El dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande presenta actividad de chaperona *in vivo*, protegiendo a otras proteínas de la desnaturalización en condiciones de estrés.
- 2) Con base en los resultados de Spy y Hsp31, consideramos que el mecanismo de la función de chaperona del dominio C-terminal depende de las zonas hidrofóbicas en la superficie del dímero, así como de interacciones electrostáticas con aminoácidos cargados que están localizados cerca o en la de la zona de unión con las proteínas parcialmente desnaturalizadas o mal plegadas.

## Objetivo general

---

Determinar el mecanismo de acción de chaperona del dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande de *N. crassa* así como su función *in vivo*.

## Objetivos particulares

---

- 1) Terminar de caracterizar la actividad de chaperona *in vitro* del dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande
  - a) Comparar la actividad de chaperona de las LSC con la chaperona Hsp31 y las SSC en diferentes condiciones desnaturalizantes
  - b) Determinar si las LSC pueden ayudar a recuperar la estructura nativa de las proteínas parcialmente desnaturalizadas
  - c) Probar si el dominio C-terminal de las LSC protege a las propias catalasas (LSC y SSC)
- 2) Elucidar el mecanismo de acción de la actividad de chaperona del dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande
  - a) Determinar si el mecanismo de acción depende de la presencia de zonas hidrofóbicas en la superficie de la proteína
  - b) Probar si se requieren las interacciones electrostáticas para la actividad de chaperona
  - c) Determinar la zona de interacción con las proteínas desdobladas
- 3) Investigar la función *in vivo* de la actividad de chaperona de las LSC
  - a) Probar si la expresión de una LSC o de su dominio C-terminal favorecen la supervivencia de *E. coli* en condiciones de estrés
  - b) Determinar la importancia de la actividad de catalasa y de chaperona de la CAT-3 en *N. crassa* durante el crecimiento, la diferenciación y en diferentes tipos de estrés

## Metodología

---

### 1. Cepas de *Escherichia coli*

Los plásmidos de este estudio se introdujeron en la cepa XL-10 gold para su preservación en congelación. Esta cepa cuenta con el siguiente genotipo: *Tetr*Δ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [*F'* *proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr*]. Esta cepa se empleó para la preservación de los plásmidos debido a que es altamente recomendada para la transformación y conservación de moléculas grandes de DNA y plásmidos con alta eficiencia, esto es debido al fenotipo Hte que incrementa su eficiencia de transformación. Además, esta cepa es deficiente en el sistema de restricción [Δ(*mcrA*)183Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173] y de la endonucleasa A (*endA1*) lo que mejora la calidad del DNA extraído posteriormente; además es deficiente en la recombinasa A (*recA*), lo que favorece la estabilidad del DNA insertado en esta cepa.

Para la expresión de las diferentes construcciones se emplearon dos cepas de *E. coli*: la cepa UM2 y la cepa BL21 codón plus. La cepa UM2 tiene un genotipo *F*<sup>-</sup>, *araC14*, *leuB6*(*Am*), *secA206*(*aziR*), *fhuA23*, *lacY1*, *proC83*, *tsx-67*, *purE42*, *glnV44*(*AS*), *galK2*(*Oc*), *LAM*<sup>-</sup>, *trpE38*, *xthA15*, *his-208*, *rfbC1*, *mgl-51*, *argG77*, *rpsL109*(*strR*), *glpR201*, *xylA5*, *mtl-1*, *ilvA681*, *thi-1*, *metA160*, *katG15*, *katE2*. Se empleó esta cepa para la expresión de las proteínas ya que carece de los genes para las dos catalasas de *E. coli*, importándonos principalmente la catalasa KatE, ortólogo de la CAT-1 de *N. crassa*. Esta cepa se adquirió por donación de Dr. Loewen (Loewen *et al.*, 1985; Loewen & Triggs, 1984).

La cepa BL21 codón plus (DE3) RIPL (Agilent #230280) tiene un genotipo *F*<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS*(*rB*<sup>-</sup> *mB*<sup>-</sup>) *dcm*<sup>+</sup> *Tet*<sup>r</sup> *gal* λ(*DE3*) *endA Hte* [*argU proL Cam*<sup>r</sup>] [*argU ileY leuW Strep/Specr*]. Se empleó esta cepa ya que es ideal para la expresión de proteínas debido a que utiliza el promotor de la RNA polimerasa T7, permitiendo altos niveles de expresión, además de contar con una copia extra de los genes *argU* (AGA, AGG), *ileY* (AUA), *proL* (CCC), *leuW* (CUA), los cuales codifican para los tRNAs que reconocen codones poco

empleados por *E. coli* y que frecuentemente restringen los niveles de expresión heteróloga de proteínas provenientes de otros organismos.

## 2. Plásmidos para la expresión de proteínas en *E. coli*

El gen de la CAT-3 de *N. crassa* se subclonó 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 cual contiene una etiqueta de seis histidinas en el amino-terminal para la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad a níquel. Tanto el dominio catalítico de la CAT-3 o CAT-3<sup>ATD</sup> (del 1 al 518 aa) y su dominio C-terminal o TDC3 (del 568 al 719 aa) se amplificaron de este último plásmido y se clonaron en el plásmido pCold I en los sitios de restricción KpnI y XbaI del sitio de clonado múltiple (MCS por sus siglas en inglés).

El gen de la chaperona Hsp31 se obtuvo a partir de DNA genómico de *E. coli* y se amplificó con oligonucleótidos específicos para clonar en el plásmido pCold I en los sitios de restricción KpnI y SalI del MCS. Todos los plásmidos se comprobaron por patrón de restricción, PCR de punto final y por secuenciación para descartar la presencia de mutaciones (la síntesis de oligonucleótidos y la secuenciación se realizaron en la unidad de biología molecular del IFC, UNAM).

**Tabla 1. Oligonucleótidos específicos empleados para la generación de los plásmidos de expresión en *E. coli***

Nombre del cebador	Secuencia 5'a 3'	Largo	Tm (°C)
pCold-Cs3-F	ACGG GGT ACC CGT GTC AAC GCT GCT CTT	28	50.3
pCold-Cs3-R good	CTAG TCT AGA_TTA GAG GCC GAG CGC AAC GGC C	22	62.3
pCold-CT F	ACGG GGT ACC CCA GCG GTG TCG ACC AGA CC	30	71.2
pCold-CT R	CTAG TCT AGA TTA CTC CTC ATC ATC GCC ATC	37	61.7
pHsp31 F	ACGG GGT ACC ATG ACT GTT CAAA ACA AGT	27	60.1



pHsp31 R	ACGC G GTC GAC TTA ACC CGC GTA AGC TGC	29	67.2
pC3s/asa R	CTAG TCT AGA TTA GAG GCC CTC CTC GAC GCC CTT G	35	69.1

### 3. Conservación, transformación de las bacterias y extracción de DNA plasmídico.

Los diferentes plásmidos se introdujeron en la cepa XL-10 gold de *E. coli* para su preservación por congelación a -80 °C, empleando glicerol al 50% (v:v) como agente crioprotector. Los protocolos para la generación de células competentes de *E. coli*, la transformación por golpe de calor (heat shock) y las condiciones de crecimiento y preservación de las bacterias se describieron previamente en Nava-Ramírez, 2017.

El DNA plasmídico se extrajo de las bacterias a partir del estuche de extracción Plasmid Miniprep Kit I (Biomiga PD1211-02), siguiendo las especificaciones del estuche y partiendo de un cultivo de 6 mL de medio en matraces de 25 mL, inoculado a partir de una colonia aislada y crecido a 37 °C, 200 rpm por toda la noche.

### 4. Expresión y purificación de las diferentes proteínas

Para la expresión de las proteínas los plásmidos se transformaron en la cepa UM2 o la cepa BL21 de *E. coli*. Las bacterias se crecieron en un cultivo a partir de una colonia de la cepa en medio LB Lennox (Sigma Aldrich L3022) suplementado con ampicilina 100 µg/mL (Sigma Aldrich A0166), a 37 °C con agitación a 200 rpm toda la noche. Este cultivo se usó como pre-cultivo y se inoculó medio nuevo en una relación 1:10 de pre-inóculo/medio, se incubó a 37 °C con agitación a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (OD<sub>600</sub>) de 0.4. Al llegar a la OD<sub>600</sub> óptima al cultivo se le añadió IPTG (NZYTech MB026) a una concentración final de 1 mM y se incubó a 16 °C con agitación a 200 rpm por 48 h; para la expresión de las catalasas se añadió al cultivo hemina pH 9.6 (Frontier Scientific H651-9) a una concentración final de 30 µM.

La proteína se extrajo y se purificó según el manual de QIAGEN de expresión de proteínas con etiqueta 6xHis (5° edición) empleando resina Ni-agarosa (QIAGEN 30250). La purificación de la proteína se comprobó por electroforesis en gel de poliacrilamida (8% o

15% de acrilamida, dependiendo la proteína y se tiñó con azul de Coomassie. Las condiciones de la electroforesis y la tinción se describen previamente en Nava-Ramírez, 2017. La CAT-1 se purificó a partir de los conidios de *N. crassa* según el método descrito en Díaz *et al.*, 2001 y Nava-Ramírez, 2017.

Después de la purificación de las proteínas, las fracciones con mayor cantidad de proteína se concentraron usando un filtro Amicon de 30,000 o 10,000 Da (Milipore Z740204, Z740200), dependiendo del caso, y se les sustituyó el amortiguador a fosfatos 50 mM pH 7.8. El amortiguador de fosfatos empleado tiene la siguiente composición:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  7.098 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.986 g/L.

## **5. Enzimas comerciales**

Se emplearon las catalasas comerciales de *Aspergillus niger*, la SSC CAT-A (Sigma Aldrich C3515) y la LSC CAT-R (Sigma 9001-05-2, producto discontinuado), así como la SSC de hígado de bovino, CAT-Bov (Sigma Aldrich C9322).

Para los diferentes ensayos de chaperona se usó la alcohol deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma Aldrich 9031-72-5), la citrato sintasa de corazón de porcino (Sigma Aldrich C-3269) y la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* (Sigma Aldrich G3153).

## **6. Ensayos de chaperona**

### **6.1. Desnaturalización por calor**

Se usó la ADH o CS a una concentración de 6  $\mu\text{M}$  como tetrámero o dímero respectivamente, en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 (Buchner *et al.*, 1998). Se midió 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 albúmina (BSA) 6  $\mu\text{M}$ . La CAT-1, la CAT-3 y la CAT-R se usaron a concentraciones de 1.5 o 3  $\mu\text{M}$  calculando su concentración como tetrámeros; el TDC3 y Hsp31 se emplearon a 6  $\mu\text{M}$  como dímero, las SSC (CAT-A y CAT-Bov), C63 y CAT-3<sup>ATD</sup> se emplearon a 6  $\mu\text{M}$  como tetrámero. Las muestras se mezclaron a temperatura ambiente en celdas de cuarzo de un mL y se llevaron a un volumen final de 900  $\mu\text{L}$ .

La desnaturalización de la CAT-3<sup>ΔTD</sup> y la CAT-Bov se realizó incubando 6 μM de estas proteínas a 55 °C durante 150 minutos, en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0, en presencia o ausencia de las otras proteínas. Se midió la dispersión de la luz de la misma manera que para el ensayo con ADH.

## **6.2. Desnaturalización con 8 M de urea**

El ensayo de chaperona usando como agente desnaturalizante 8 M de urea se realizó midiendo la dispersión de la luz a 360 nm en un espectrofotómetro Beckman DU650 a 360 nm (Horwitz, 1992). Se emplearon como sustrato las enzimas ADH o la β-gal. Las diferentes proteínas (chaperonas) se mezclaron con la proteína sustrato, ADH o β-gal, a temperatura ambiente antes de la incubación con urea 8 M, en Tris 100 mM, pH 8.0, durante 30 min. Después de la incubación, la muestra se diluyó 30 veces con Tris 100 mM, pH 8.0, para lograr una concentración final de 0.5 μM de ADH o β-gal e inmediatamente se leyó la dispersión de la luz a temperatura ambiente durante 180 min tomando lectura cada 20 s, en celdas de cuarzo de un mL en un volumen final de 900 μL.

## **6.3. Desnaturalización por oxidación con peróxido de hidrógeno**

El ensayo de chaperona usando como agente desnaturalizante 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizó midiendo la dispersión de la luz a 360 nm en un espectrofotómetro Beckman DU650. Se empleó la ADH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente oxidante debido a que se ha descrito previamente el proceso de desnaturalización de esta enzima (Men & Wang, 2007). Se hicieron las lecturas en celdas de cuarzo de un mL, empleando amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.8, se adicionó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 500 μM, se calculó su concentración midiendo su absorbencia a 240 nm y empleando su coeficiente de extinción de 43.6M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. La ADH se usó a una concentración final de 6 μM considerando el tetrámero. Las catalasas de subunidad grande se emplearon a 3 μM considerándolas como tetrámero, el TDC3 y Hsp31 se usaron al 6 μM considerando el dímero, así mismo las SSC se usaron a esta concentración pero considerando el tetrámero. Las catalasas se inactivaron incubando previamente en 3 mM de azida de sodio por 30 min a 37 °C y eliminando el exceso de azida por diálisis.

## **7. Medición de las actividades enzimáticas**

### **7.1. Actividad de la alcohol deshidrogenasa**

La actividad se determinó mediante el seguimiento de la formación del NADH en un espectrofotómetro Beckman DU650 a 340 nm a 30 °C, después de la incubación por 150 min a 25 °C o 45 °C en ausencia o presencia de las diferentes enzimas usadas en el ensayo. La actividad se midió en celda de cuarzo de 1 mL donde se adicionó en amortiguador de fosfatos pH 7.4 la proteína tomada del ensayo anterior (considerando una concentración final de 1 µg de ADH),  $\text{NAD}^+$  1 mM y usando como sustrato etanol 200 mM.

### **7.2. Actividad de citrato sintasa**

La actividad de la CS se determinó usando 0.2 mM de acetyl coenzima A, 0.5 mM de oxalacetato (OAA) y 0.1 mM de DTNB en Tris 100 mM pH 7.5. La reacción se siguió en un espectrofotómetro Beckman DU650 a 412 nm a 25 °C por 20 min tomando lectura cada 10 s. La actividad se midió en celda de cuarzo de 500 µL en un volumen final de 450 µL, donde se adicionó en amortiguador de fosfatos pH 7.5 (Morgunov & Srere, 1998). Se empleó la enzima usada en el ensayo de chaperona después de terminar cada lectura, se consideró una concentración final de CS de 0.5 µM.

### **7.3. Actividad de $\beta$ -galactosidasa**

La actividad de la  $\beta$ -gal se determinó mediante la prueba colorimétrica del o-nitrofenil-D-galactopiranosido (ONPG), usando un espectrofotómetro Beckman DU650 a 420 nm a 25 °C por 30 min, tomando lectura cada 10 s. Se empleó un amortiguador de ensayo consistente en fosfato de sodio 100 mM pH 7, 1 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 50 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, se empleó como sustrato ONPG 0.665 mg/mL en agua destilada. La actividad de la enzima  $\beta$ -gal se midió después de los ensayos de desnaturalización, en una celda de cuarzo de 1 mL con un volumen final de 900 µL, se consideró una concentración final de enzima de 9.2 µg o 5 U/mL.

#### **7.4. Actividad de catalasa**

Para detectar la actividad de catalasa en el gel de poliacrilamida, se corrió la electroforesis de las catalasas en condiciones no desnaturalizantes en amortiguador de corrida no desnaturalizante (glicina 1.44% (p:v), Trizma base 0.3% (p:v), pH 7.0), durante 2 h a 150 V.

El gel se fijó en metanol al 5% (v:v) durante dos minutos, se enjuagó con agua destilada y luego se incubó en una solución de  $H_2O_2$  al 0.03% (v:v) durante 5 min, se enjuagó con agua destilada, y después con ácido acético al 10% (v:v) 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 al gel) hasta que el gel se tiña de azul debido a la precipitación de las sales con el  $H_2O_2$ .

#### **8. Ensayo de recuperación de la actividad de la alcohol deshidrogenasa**

Se empleó a una concentración de 0.6  $\mu M$  de ADH en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 y se desnaturalizó incubando a 45 °C por dos horas y media. Posteriormente a su desnaturalización, se le añadieron las diferentes proteínas a una concentración equimolar, BSA (para el control), o la CAT-3, TDC3, CAT-A o Hsp31 a las concentraciones empleadas en ensayos anteriores. Se mezcló por pipeteo y se incubaron por diferentes tiempos (0, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos) a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación inmediatamente se leyó la actividad de la ADH mediante la formación del NADH por espectrofotometría a 340 nm.

#### **9. Determinación de la presencia de zonas hidrofóbicas con la sonda bis-ANS**

Las diferentes proteínas se emplearon a una concentración de 0.8  $\mu M$  en amortiguador de fosfatos pH 7.0 y se incubaron con un exceso de la sonda bis-ANS a una concentración de 1.2  $\mu M$ . Se realizaron dos incubaciones una a temperatura ambiente (22 °C) y otra a 45°C por 30 minutos. Posteriormente se leyó la fluorescencia en un lector de microplacas Synergy Mx, excitando a 370 nm y leyendo la emisión en un rango de 400 a 600 nm a temperatura ambiente.

## **10. Inhibición de la actividad de chaperona con la sonda bis-ANS**

Las proteínas la CAT-3 y la CAT-1 a 3  $\mu\text{M}$ , la Hsp31 y el TDC3 a 6  $\mu\text{M}$  en amortiguador de fosfatos pH 7.0 se incubaron 30 min a 45 °C con la sonda bis-ANS a una concentración de 12  $\mu\text{M}$ , posteriormente se expusieron a luz UV a 360-70 nm por 10 min a temperatura ambiente, mediante lo cual se genera un enlace covalente entre el grupo sulfonato de la sonda y el aminoácido positivo al que se unió. Después de irradiar las proteínas se eliminó el exceso de sonda usando una columna de Sephadex G-25. Se emplearon estas proteínas para el ensayo de desnaturalización de la ADH a 45 °C empleando el método antes descrito.

## **11. Determinación de las interacciones electrostáticas mediante el aumento de la fuerza iónica**

Se empleó amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0 con una fuerza iónica de 0.028 M. Para aumentar la fuerza iónica del amortiguador se le añadieron diferentes concentraciones de NaCl 0, 0.075, 0.150, 0.3, 0.7, 1 M (Hossain & Aso, 2016; Koldewey et al., 2016). Se usaron las diferentes proteínas CAT-3 3  $\mu\text{M}$ , TDC3 6  $\mu\text{M}$ , Hsp31 6  $\mu\text{M}$  en el amortiguador con diferente concentración de NaCl para determinar la desnaturalización de la ADH a 45 °C empleando el método antes descrito.

## **12. Determinación de las cavidades del dímero del dominio C-terminal de la catalasa-3 y predicción de los posibles sitios de interacción con otras proteínas**

Para la predicción *in silico* de las cavidades se empleó el servidor CASTp 3.0 (por Computed Atlas of Surface Topography of proteins, o atlas computarizado de la topografía de la superficie de las proteínas), el cual predice las propiedades geométricas y topológicas de las superficies de las proteínas, incluyendo cavidades superficiales e interiores y canales transversales, los cuales pueden tener importancia en la actividad de las proteínas o la interacción de éstas con otras macromoléculas (Tian et al., 2018). Se empleó la estructura cristalográfica del dímero del dominio C-terminal mediante la modificación del cristal con código del PDB 3EJ6 y los parámetros ideales del servidor.

Para la predicción de las zonas de interacción con otras proteínas se empleó el servidor InterProSurf, el cual predice la probabilidad de interacción de los residuos de aminoácidos de la proteína de interés con otras proteínas, basándose en la accesibilidad al solvente de la superficies de la estructura 3D de las proteínas (Negi et al., 2007). Se empleó la estructura cristalográfica del dímero del dominio C-terminal mediante la modificación del cristal con código del PDB 3EJ6 y los parámetros ideales del servidor.

### **13. Construcción de los dominios CAT-3<sup>Δ17aa</sup> y TDC3<sup>Δ17aa</sup>**

Para la realización de las variantes sin los últimos 17 aminoácidos del extremo carboxilo se diseñó el oligonucleótido pC3s/asa R para eliminar esta región e introducir en el plásmido pCold I empleando el sitio de restricción XbaI como en la variantes completa (secuencia del oligonucleótido en Tabla I). Los plásmidos obtenidos se comprobaron por secuenciación. Se clonaron en la cepa UM2 para su expresión y purificación como se describe previamente para las otras proteínas. Los péptidos obtenidos se emplearon en el ensayo de desnaturalización de la ADH a 45 °C usando el método antes descrito.

### **14. Ensayo de supervivencia de *E. coli***

Para evaluar si el dominio C-terminal de las LSC aumentan la supervivencia de *E. coli* ante el estrés con calor, oxidante u osmótico, se empleó la cepa UM2 de *E. coli*, y transformada con los plásmidos para expresar Hsp31, CAT-3, TDC3 o CAT-3<sup>ΔTD</sup> respectivamente en el sistema pCold I.

Se creció un pre-cultivo de las diferentes cepas a 37 °C por 12 h 200 rpm, del cual se inocularon 10 mL de medio para llevarlo a una DO<sub>600nm</sub> de 0.01, se incubaron hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> de 0.2 a 37 °C 200 rpm y se indujeron con IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubaron a 18 °C a 200 rpm hasta llegar a DO<sub>600nm</sub> de 1.2 correspondiente a la fase de crecimiento estacionario. Después de la inducción de la expresión de las proteínas se recuperaron los diferentes cultivos incubando a 37 °C 200 rpm por 1 hora. El medio se suplementó con 15 mM de hemina pH 9.6 durante la inducción de las cepas CAT-3 o CAT-3<sup>ΔTD</sup>.

Posteriormente se sometieron a las condiciones de estrés y se pasaron a placas de 96 pozos para su medición con un volumen de 100  $\mu$ L de cultivo y 50  $\mu$ L de aceite de parafina estéril para evitar la desecación. El crecimiento se siguió en un lector de placas Synergy Mx a 37 °C midiendo la absorbencia a 600 nm cada 20 min con una agitación fuerte de 20 segundos previa a la lectura, hasta llegar a fase estacionaria (48 h).

#### **14.1. Crecimiento de *E. coli* después de un estrés por calor**

Para determinar el crecimiento después del estrés con calor, se incubaron las diferentes cepas a 55 °C por diferentes tiempos (0, 10, 30 y 60 min) sin agitación. Posteriormente se pasaron a las placas de 96 pozos para medir su crecimiento después del estrés. Para la determinación del porcentaje de supervivencia se tomó el promedio de tres experimentos independientes del valor final de la DO<sub>600</sub> del crecimiento de cada cepa sin ser sometida al estrés como el 100%. El ensayo se realizó por triplicado y en cada placa de 96 pozos se puso por triplicado cada punto.

#### **14.2. Crecimiento de *E. coli* después de un estrés oxidante**

Se probó el crecimiento después de un estrés oxidante, incubando las cepas con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 3, 5, 7, 10, 15, 20 y 30 mM) por 25 min a temperatura ambiente. Posteriormente estos cultivos se diluyeron 30 veces en medio LB fresco y se midió su crecimiento. Para la determinación del porcentaje de supervivencia se tomó el promedio de tres experimentos independientes del valor final de la DO<sub>600</sub> del crecimiento de cada cepa sin ser sometida al estrés como el 100%. El ensayo se realizó por triplicado y en cada placa de 96 pozos se puso por triplicado cada punto.

#### **14.3. Crecimiento en presencia del estrés osmótico**

Se crecieron las diferentes cepas en medio LB suplementado con diferentes concentraciones de NaCl (0, 0.15, 0.3, 0.7 y 1 M), para ello se inocularon las diferentes cepas, después de la inducción de las proteínas, a una DO<sub>600</sub> de 0.05 en las placas de 96 pozos. Para determinar el porcentaje de crecimiento se consideró como el 100% el crecimiento de las diferentes cepas en medio LB sin adición de NaCl. El ensayo se realizó por triplicado y en cada placa de 96 pozos se puso por triplicado cada punto.



## 15. Cepas de *N. crassa*

La cepa silvestre 74-OR231A obtenida del “Fungal Genetics Stock Centre” (FGSC), del linaje ST. Lawrence (Oak Riidge, Cal. E. U.), se empleó para la purificación de la CAT-1 y como control para los ensayos fisiológicos.

Para la generación de las cepas que sirvieron como huéspedes de las construcciones con etiquetas fluorescentes se emplearon las siguientes cepas: la cepa FGSC #9718 con genotipo  $\Delta mus-51::bar+$ , la cepa FGSC #9717 con genotipo  $\Delta mus-51::bar+; his3^-$ ; la cepa FGSC #11201 con genotipo  $\Delta cat-3$  y la cepa FGSC #17609 con genotipo  $\Delta al-1$ . Estas cepas se cruzaron sexualmente para obtener las cepas  $\Delta al-1; \Delta mus-51$  y  $\Delta al-1; \Delta mus-51; his3^-; \Delta cat-3$ .

## 16. Condiciones de crecimiento y conservación de las cepas de *N. crassa*

*N. crassa* se crece comúnmente en medio mínimo Vogel-sacarosa (VS) (Davis & de Serres, 1970), para este trabajo se empleó 1.5% de sacarosa como fuente de carbono con 2% de sales de Vogel 50X y 1.8% de agar para los medios sólidos, manteniendo una proporción de 5:1 aire/medio y una temperatura de incubación de 30 °C. Se Los medios para el crecimiento de las cepas auxótrofas de histidina se suplementaron con este aminoácido a 0.2 mg/mL.

Las sales de Vogel al 50X contienen

Citrato trisódico $\cdot 2 H_2O$	125 g
$KH_2PO_4$	250 g
$NH_4NO_3$	100 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	10 g
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ (disolver por separado)	5 g
Solución de elementos traza	5 mL
Solución de biotina	2.5 mL
Ajustar con agua	1 L
Cloroformo (conservador)	10 mL

La solución de elementos traza contiene:

Ácido cítrico · 1 H <sub>2</sub> O	5 g
ZnSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	5 g
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1 g
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0.25 g
MnSO <sub>4</sub> · 1 H <sub>2</sub> O	0.05 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (anhidro)	0.05 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.05 g
Ajustar con agua	100 mL
Cloroformo (conservador)	1 mL

Las sales de Vogel y los elementos traza se almacenaron a temperatura ambiente en frascos color ámbar.

La solución de biotina contiene 5 mg de biotina disuelta en 50 mL de etanol al 50% (v:v) con agua destilada estéril. Esta solución se almacenó a -20 °C protegida de la luz.

Para la obtención de conidios se inocula VS-agar con  $1 \times 10^6$  conidios/mL o con micelio de las cepas, se crece a 30 °C en la oscuridad por 3 días y posteriormente a 25 °C en presencia de luz por dos días. Los conidios se colectan con agua fría estéril 8-4 °C con agitación manual vigorosa. Se almacenaron a -80 °C en alícuotas de 1 mL.

## 17. Cruzas sexuales de *N. crassa* y selección de las mutantes

Para la inducción del ciclo sexual del hongo se emplea el medio llamado “Synthetic Cross Media” (SC) (M. Westergaard, 1947), el cual tiene la siguiente composición (stock 2X):

KNO <sub>3</sub>	2.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhidro)	1.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (anhidro)	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1.0 g
NaCl	0.2 g

CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O (disolver por separado)	0.2 g
Solución de biotina	0.1 mL
Solución de elementos traza	0.2 mL
Ajustar con agua	1 L
Cloroformo (conservador)	10 mL

El medio se utilizó en cajas Petri en estado sólido empleando 1.8% de agar (p:v); éstas se inocularon con  $1 \times 10^6$  conidios de la cepa aceptora. Las cajas se incubaron a 25 °C en presencia de luz por 10 días o hasta la formación de protoperitecios, posteriormente se añadieron gotas con conidios de la cepa donadora y se siguió incubando bajo las mismas condiciones hasta la generación de peritecios maduros y la liberación de las esporas sexuales o ascosporas (aproximadamente 14 días más).

Las ascosporas se recolectaron de la tapa de las cajas Petri con agua destilada estéril por acción mecánica generada con la micropipeta. Para la activación de las ascosporas se incubaron a 60 °C por 30 min, posteriormente se sembraron y dispersaron 200 ascosporas por caja Petri en medio de colonia aislada suplementado con el medio de selección y se incubaron a 30 °C en oscuridad de 24 a 48 h dependiendo de la cepa. Para las mutantes resistentes a la higromicina se empleó este antibiótico a una concentración 200 µg/mL. La selección de las mutantes donde se comenzó la auxotrofia a la histidina se realizó en medio sin el aminoácido.

El medio de colonia aislada tiene la siguiente composición:

Solución A		Solución B	
Vogel 50x	2 mL	L-sorbosa	2 g
Fructuosa	0.05 g	Agar	1.8 g
Glucosa	0.05 g	Agua	65 mL
Agua	35 mL		

Una vez esterilizadas por calor húmedo, ambas soluciones se mezclan.

Una vez que se puede observar que las ascosporas han germinado se traspasaron mediante una aguja de jeringa a tubos inclinados (slants) con medio VS-agar suplementados con el

medio de selección y se incubaron para generar conidios como el método referido anteriormente para su propagación.

### **18. Extracción de DNA del micelio de *N. crassa***

Se inocularon 20 mL de medio VS en matraces Erlenmeyer de 50 mL con  $1 \times 10^6$  conidios/mL y se incubaron a 30 °C sin agitación por 72 h en oscuridad. El micelio se recuperó empleando una espátula y se retiró la mayor cantidad de líquido secando con toallas de papel. Posteriormente se depositó en microtubos de 2 mL y se congeló con nitrógeno líquido para liofilizar hasta secar por completo, aproximadamente por 2 horas.

Una vez seco el micelio se trituró hasta convertirse en polvo fino con un homogeneizador y se le añadieron 800 µL de amortiguador de extracción (EDTA 50 mM pH 8, SDS 0.2% (p:v), DEPC 1 µL/mL este se añade hasta el momento de usarse) integrando por agitación con Vortex hasta que esté homogéneo. Los tubos se calentaron a 68 °C por 30 min y posteriormente se centrifugaron 5 min a 13,000 rpm a temperatura ambiente. Se separó el sobrenadante en tubos limpios y se les agregó 50 µL de acetato de potasio 3 M pH 5, se mezcló por inversión y se incubaron los tubos en hielo por 8 min.

Posteriormente los tubos se centrifugaron 5 min a 13,000 rpm y se separó el sobrenadante en tubos nuevos. Se añadió al sobrenadante 600 µL de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se centrifugó por 10 min a 13,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Ésta se volvió a suspender en 500 µL de amortiguador TE (Tris-Cl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8) y se centrifugó por 10 min a 13,000 rpm. Se traspasó el sobrenadante a tubos nuevos y se precipitó el DNA con 800 µL de etanol absoluto frío (4 a 8 °C) y 15 µL de LiCl 10 M, se incubó 10min en hielo. Se centrifugó por 3 min a 13,000 rpm y se lavó la pastilla con etanol frío (4 a 8 °C) al 70% (v:v) dos veces. La pastilla secó completamente a temperatura ambiente y se volvió a suspender en 100 µL de agua destilada estéril. El DNA se guardó a -20 °C hasta su uso.

### **19. Construcciones de las proteínas con etiquetas fluorescentes**

Las construcciones para etiquetar ambos dominios de la CAT-3 de *N. crassa* con etiquetas fluorescentes están representados en la Figura 18 de los resultados. Se etiquetó el dominio

catalítico de la CAT-3 con la GFP en su extremo amino. El dominio C-terminal se etiquetó con la proteína mCherry en su extremo amino. Se emplearon los siguientes oligonucleótidos:

**Tabla 2. Oligonucleótidos específicos empleados para la generación de las construcción para etiquetar los dominios de la CAT-3 y transformarlos en *N. crassa***

Nombre del cebador	Secuencia 5'a 3'	Largo	Tm (°C)
pCold C3GH F KpnI	AGGTAGGCATATGGAGCTCGGTACCATGCGTGTCAAC GCTCTTCTACC	48	75.8
Cs3-R' gfp	GCT CCT CGC CCT TGC TCA C GGC GAT GGT GGG GAG GCT CTC G	41	77.5
C3s/CT LKT	AGA GCC TCC CCA CCA TCG CC GGT GAC GGT GCT GGT TTA	38	73.1
Oligo HPH-R	GGT CAT CCC ATT GTT ATC AAA TAT TCC TTT GCC CTC GGA	39	65.5
pCold C3GH R XbaI	AGC AGA GAT TAC CTA TCT AGA CGT ATG TCT CTC CTT CCT CCT CG	44	69.3
mCherry-F- XbaI	GC TCT AGA ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG G	27	64.3
mChery-CT R	GGA GAG GAC GCC GAC GCG GAG GGT CCT CTA AAC AAG TGT ACC	46	73.5
mCherry-CT c/asa R	GGA GGC TCT CGT TGA AGA TGG A CCT CTA AAC AAG TGT ACC	40	68.6
CT-R	C CCG GAA TTC TTA CTC CTC ATC ATC GCC ATC AAC G	25	57.7

La construcción CAT-3/GFP se diseñó para integrar los fragmentos mediante el estuche In-Fusion HD Cloning (Takara 639649) siguiendo las instrucciones del manual de uso. Esta construcción se diseñó para la inserción en el plásmido pCold I, amplificando el gen de la CAT-3 del DNA genómico de la cepa WT de *N. crassa* con los oligonucleótidos pCold C3GH F KpnI y Cs3-R' gfp; la GFP unida a HPH se amplificó del plásmido pUC/GFP (Suaste-Olmos et al., 2018) con los oligonucleótidos C3s/CT LKT y HPH-R; y la región cat-3 3' se amplificó del DNA genómico de la cepa WT de *N. crassa* usando los oligonucleótidos C33 F y pCold C3GH R XbaI.

La construcción mCherry/C-terminal se diseñó para ser unida mediante una PCR de fusión y ser insertada por ligación al plásmido pJV15-2 usando las enzimas EcoRI y XbaI (Ramírez Cota, 2010). El fragmento mCherry se amplificó del plásmido pJV15-2 con los oligonucleótidos mCherry-F-XbaI y mCherry-CT R; mientras que el fragmento del gen correspondiente al dominio C-terminal de la CAT-3 se amplificó del DNA genómico de una cepa WT de *N. crassa*. Se comprobaron ambas construcciones por secuenciación.

## **20. Transformación de conidios de *N. crassa* por electroporación**

Se transformaron conidios recién cosechados, los cuales se incubaron previamente durante tres días a 30 °C, posteriormente se incubaron a 25 °C en presencia de luz durante 10 días para permitir su maduración. Se colocaron  $1.25 \times 10^8$  conidios en un microtubo de 1.5 mL estéril, se centrifugaron por 1 min a 9,000 rpm a 4 °C y se le eliminó por completo el agua sustrayendo con una micropipeta. La pastilla se resuspendió suavemente en 500 µL de sorbitol 1 M frío (4 a 8 °C) y se centrifugó por 30 s a 5,000 rpm a 4 °C repitiendo el lavado dos veces. En la última centrifugación se elimina por completo el líquido y la pastilla se vuelve a suspender en 40 µL de sorbitol, se añadió 1 µg de DNA de la construcción de interés ajustando el volumen final a 50 µL y mezclando hasta homogeneizar con la micropipeta. Los tubos se incubaron por 30 min en hielo. Los conidios se transfirieron a una celda para electrochoque de 0.2 cm enfriada previamente a 4 °C y se trataron con el programa Scp2 en un electroporador MicroPulser (BioRad 165-2100).

Inmediatamente después de aplicar el pulso se adicionó a la celda 960 µL de sorbitol 1 M frío (4 a 8 °C) y los conidios se transfirieron a un tubo de 50 mL con 25 mL de solución de

recuperación estéril (2 mL de Vogel 50x en 100 mL de agua). Se incubó por dos horas a 30 °C con agitación a 100 rpm. Posteriormente se agregó al tubo 25 mL de top agar a una 40 °C y se mezcló perfectamente. La mezcla se vertió sobre cajas Petri con medio de colonia aislada suplementado con el medio de selección, procurando dejar una película delgada con la solución de conidios. Las cajas se incubaron a 30 °C en oscuridad hasta la germinación de las colonias, entre 2 y 6 días de incubación. Las colonias se traspasaron a tubos inclinados con medio VS suplementado con el medio de selección para la obtención de conidios. El protocolo se realizó manteniendo esterilidad en todo momento.

La solución del top agar contiene:

Solución 1		Solución 2	
Sorbosa	2 g	Glucosa	0.05 g
Agar	1 g	Fructosa	0.05 g
Sorbitol	18.22 g	Vogel 50x	2 mL
Aforar con agua	50 mL	Aforar con agua	50 mL

Una vez esterilizadas por calor húmedo ambas soluciones se mezclan.

Para limpiar el fondo genético de las cepas transformadas y obtener cepas homocariontes se transfirió una colonia aislada de cada cepa y se dispersó formando estrías sobre cajas de Petri con medio de colonia aislada suplementada con el marcador de selección, este procedimiento se realizó tres veces. Las cepas se comprobaron por amplificación por PCR punto final de las construcciones insertadas amplificando con un oligonucleótido río arriba del sitio de inserción y el oligonucleótidos del extremo 3' de la construcción.

## **21. Determinación del fenotipo de las cepas del hongo *N. crassa***

### **21.1. Medición del crecimiento**

La medición del crecimiento de *N. crassa* se realizó en tubos para crecimiento en pista o "race tubes" con medio VS-agar (especificaciones de los "race tubes" en la página del FGSC). Para la inoculación de los tubos de pista se cultivaron  $1 \times 10^6$  conidios en caja Petri con medio VS-agar y se incubaron a 30 °C por 12 h, de la caja Petri se tomó un bocado de 0.5 cm con micelio y se colocó sobre uno de los extremos del tubo de pista. Estos tubos se

incubaron a 30 °C y se realizaron marcas en el frente de crecimiento cada 12 h hasta obtener un mínimo de 6 marcas.

Para la medición del crecimiento en condiciones de estrés por altas temperaturas, se pasaron los tubos de pista después de la primera marca con incubación a 30 °C a una incubadora a 42 °C con o sin luz. En el experimento de la medición del crecimiento en oscuridad los tubos se recubrieron con papel aluminio y se marcaron en una habitación oscura con luz roja.

Para la medición del crecimiento en condiciones de estrés oxidante, se emplearon cajas Petri con medio VS-agar a las cuales se les añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes concentraciones (0, 1, 3 y 5 mM). Las cajas se inocularon mediante un bocado de un cultivo sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se incubaron a 30 °C en presencia de luz ambiental. Se realizó la primera marca 12 h después de la inoculación y se marcó el frente de crecimiento cada hora por 7 h.

### **21.2. Producción de conidios**

Para la determinación de la producción de conidios se inocularon con  $1 \times 10^6$  conidios en tubos inclinados con medio VS-agar, y para favorecer el intercambio de gases se emplearon tapones de algodón. Se incubaron por 3 días a 30 °C en oscuridad y dos días a 25 °C en luz para la generación de conidios. Posteriormente se colectaron los conidios en un volumen estándar para todos los tubos de 6 mL de agua destilada estéril a 4 °C y se realizó el conteo de los conidios en una dilución 1:100 conidios/agua empleando una cámara de Neubauer.

### **21.3. Producción de micelio aéreo**

Para medir la producción de micelio aéreo se midió la altura del micelio aéreo en tubos de ensaye de vidrio de 20 X 1.5 cm con tapón de algodón y medio VS-agar en una relación 1:3 inoculado con  $1 \times 10^6$  conidios. Los tubos se incubaron 3 días a 30 °C en oscuridad y 2 días a 25 °C en luz. Para medir la altura del micelio aéreo se empleó el borde del agar como base y considerando el tamaño del micelio aéreo hasta el final las hifas, se realizaron 5 mediciones por tubo.



#### **21.4. Germinación de conidios en medio de colonia aislada**

Para determinar la germinación de los conidios de cada cepa se inocularon y dispersaron 200 conidios en cajas Petri con medio de colonia aislada. Las cajas se incubaron a 30 °C y se contaron las colonias germinadas cada 24 h hasta 72 h.

#### **22. Determinación del tipo de dimerización del dominio C-terminal**

Se obtuvieron las estructuras cristalográficas del PDB. Los códigos de acceso del PDB de cada proteína son: DJ-1 1ucf, YhBO 1io4, Hsp31 1izy, YDR533Cp 1qvw. Las estructuras cristalográficas del dímero y monómero del dominio C-terminal de las LSC se obtuvieron mediante la modificación de los cristales con código del PDB: CAT-1 3ej6, CAT-1 1sy7, PVC 2xf2, HP11 5bv2, catalasa de *M. thermophilus*.

Para determinar el área de interacción de los dímeros de las cuatro clases previamente definidas se corroboraron las interacciones entre aminoácidos empleando la base de datos PDBsum. Para determinar el área de interacción del dímero del dominio C-terminal de la CAT-3 se utilizó la herramienta en línea PDBePISA con la cual se definieron los residuos que interaccionan en la interfaz así como el tipo de interacción. Los alineamientos de las estructuras se realizaron usando el programa PDBeFold.

#### **23. Alineamiento estructural de la estructura cristalográfica del dominio C-terminal**

Se usó el servidor POSA para realizar el alineamiento estructural de las proteínas (Li *et al.*, 2014), del cual se obtuvo un archivo PDB. Se emplearon los parámetros ideales del servidor. Mediante el programa PyMOL v1.7.4.4 se modificaron las estructuras para generar las imágenes usadas en la Figura 3 y 27.

## Resultados

---

### 1. El dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande representa una nueva forma de dimerización de la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI

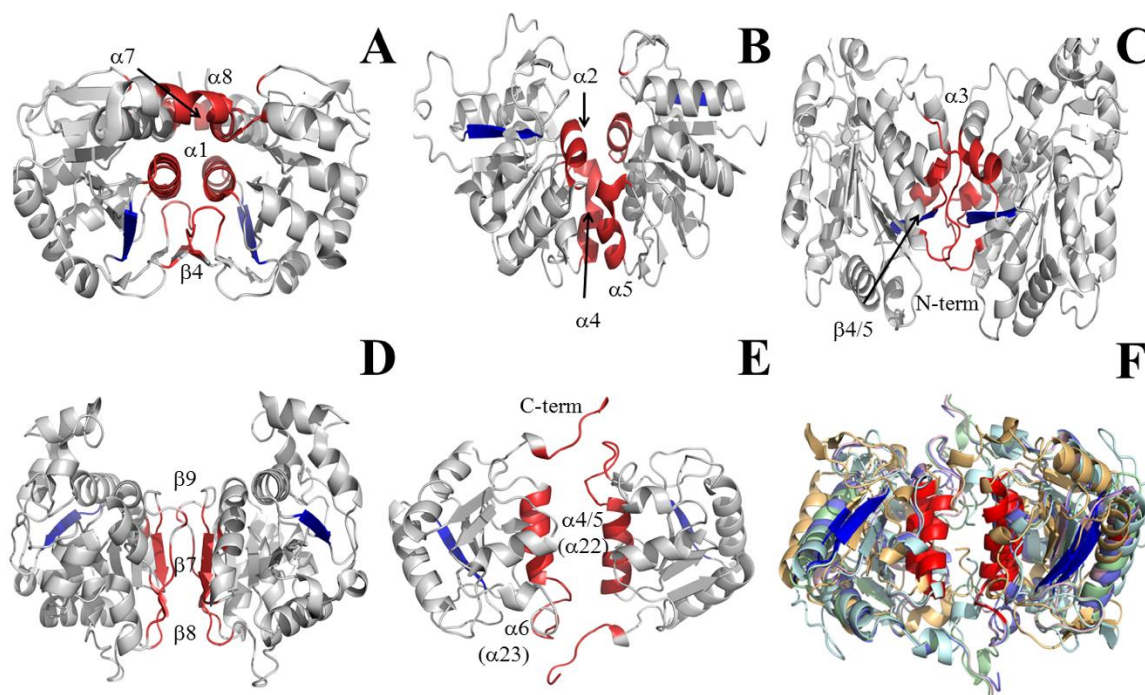
El dominio C-terminal de las LSC se considera como parte de la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI debido a que tienen un dominio DJ-1 conservado (ver Figura 4 y alineamiento de secuencias Apéndice I.2) (Bandyopadhyay & Cookson, 2004; Lucas & Marín, 2007). Los miembros de la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI se clasifican según la manera en que interaccionan los monómeros para formar el dímero, identificando cuatro tipos de interacción, tipo DJ-1 (PARK7) (animales), tipo YhbO (*E. coli*), tipo Hsp31 (*E. coli*) y tipo YDR (*S. cerevisiae*), los cuales se caracterizan por tener regiones de interacción específicas del I al IV (Jung *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2007).

Las regiones I son características de la clase tipo DJ-1 y constan de la hélice  $\alpha 1$ , la hebra  $\beta 4$ , la parte amino terminal de la hélice  $\alpha 7$ , la parte del extremo carboxilo de la hélice  $\alpha 8$ , además de dos regiones de bucle que están entre  $\beta 3$ - $\beta 4$  y entre  $\beta 11$  y la hélice  $\alpha 7$  (Figura 6 A). Las regiones II son características de la clase tipo YhbO e involucran tres hélices en la interacción, la  $\alpha 2$ , la  $\alpha 4$  y la  $\alpha 5$  (Figura 6 B). Las regiones III son características de las Hsp31 y consisten de los 21 residuos del extremo amino, la región de  $\beta 4$  a  $\beta 5$  y los bucles entre  $\beta 6$  y  $\alpha 3$ . Es importante mencionar que la Hsp31 de *E. coli* cuenta con un asa de 45 residuos adicional entre las regiones I y II que también están implicadas en la interacción (Figura 6 C). Las regiones IV son características de las proteínas tipo YDR y consisten en la región comprendida entre  $\beta 7$  y los residuos de la  $\beta 8$  a la  $\beta 9$  (Figura 6 D) (Jung *et al.*, 2012).

El dominio C-terminal de las LSC forma un dímero en cada extremo de la forma tetramérica de las catalasas, sin embargo, esta forma dimérica no coincide con ninguna de los tipos de la clasificación reportada actualmente. En el dímero de dominios C-terminal de la CAT-3 de *N. crassa* se identificaron las zonas de interacción de la forma dimérica de este dominio y se denominaron como regiones V. Estas regiones están comprendidas por la interfaz entre la hélice  $\alpha 22$  de la catalasa, que correspondería a las hélices  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$  de la

estructura de la DJ-1 humana, así como el asa entre esta región y la hélice  $\alpha 23$  (correspondiente a la  $\alpha 5$  en DJ-1) y al extremo carboxilo del dominio C-terminal (Figura 6 E).

Las estructuras cristalográficas del dímero del dominio C-terminal de otras catalasas de subunidad grande se encuentran las mismas zonas de interacción que hemos denominado regiones V, siendo la hélice  $\alpha 22$  de la CAT-3 que corresponde a la  $\alpha 26$  de la CAT-1, a la  $\alpha 30$  de la PVC de *Penicillium vitale*, a la  $\alpha 32$  de la HP11 de *E. coli* (katE) y a la  $\alpha 28$  de la catalasa de *Mycobacterium thermophilus*. En todas las catalasas participa también el extremo carboxilo (Figura 6 F).



**Figura 6. Tipos de dimerización de los miembros de la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI.** A) Dímero tipo DJ-1, regiones de interacción I. B) Dímero tipo YhbO, región II. C) Dímero tipo Hsp31, regiones III. D) Dímero tipo YDR, regiones IV. E) Dímero tipo dominio C-terminal de las LSC, regiones V. F) Superposición de los dímeros del dominio C-terminal de cinco LSC que cuentan con estructura cristalográfica: CAT-1 (cian pálido) y CAT-3 (azul pálido) de *N. crassa*, PVC (verde pálido) de *P. janthinellun*, HP11 (anaranjado pálido) de *E. coli* y la catalasa de *M. thermophilus* (rosa pálido). Estructuras secundarias de las

diferentes proteínas representantes de cada tipo de forma dimérica con las regiones de interacción marcadas en rojo. Para orientar la posición de los monómeros se marcó la  $\beta 1$  en color azul. Figura basada en la de Jung *et al.*, 2012 con el dímero del C-terminal de las LSC.

La estructura cuaternaria de la DJ-1 humana es importante, ya que la oligomerización anormal en esta proteína está asociada con enfermedades neurodegenerativas. La forma de interacción de los dímeros también está asociada con su relación filogenética a nivel de secuencia y puede ayudar a entender la forma en que estas proteínas interaccionan con las proteínas desdobladas (Jung *et al.*, 2012).

## **2. Caracterización de la actividad de chaperona *in vitro* del dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande**

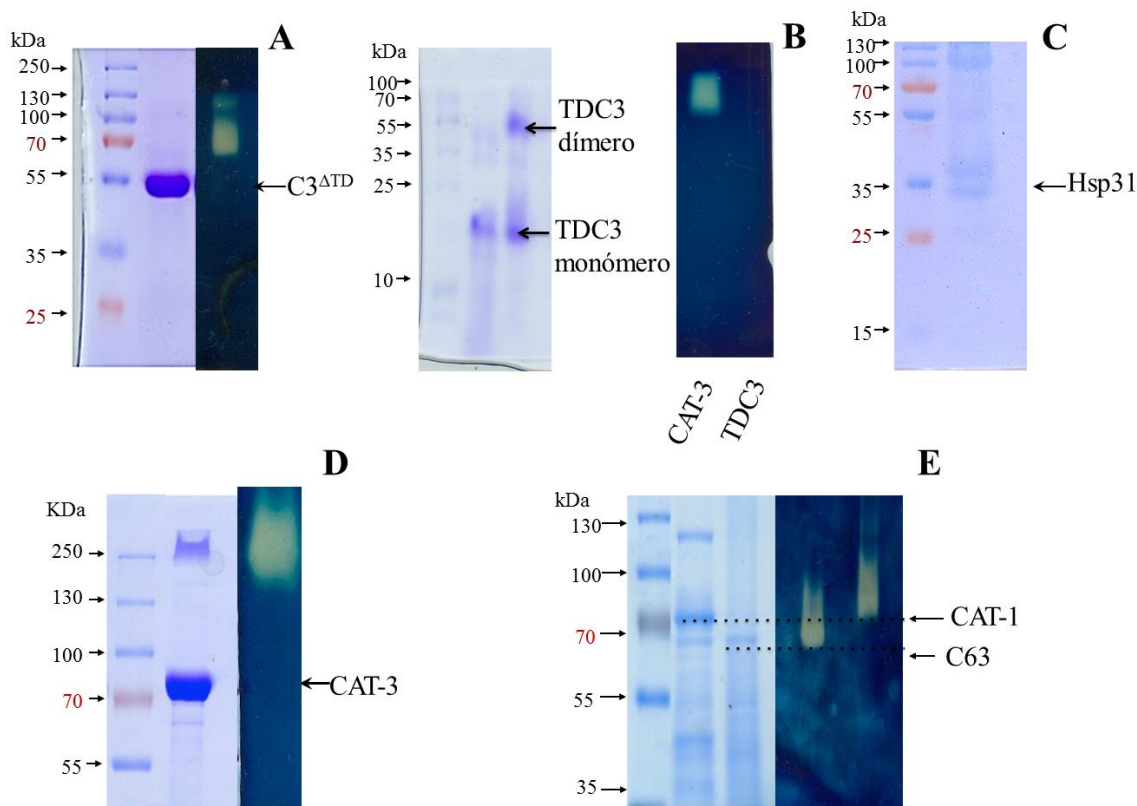
Anteriormente se reportó que la CAT-1 y la CAT-3 de *N. crassa* tienen actividad de chaperona y que esta actividad tiene relación con el dominio C-terminal, ya que la pérdida de este dominio causaba la pérdida de la actividad de chaperona de las LSC (Nava-Ramírez, 2017). Sin embargo, era necesario realizar una caracterización más exhaustiva con los controles requeridos.

### **2.1. Expresión y purificación de las diferentes proteínas**

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen *cat-3* de *N. crassa* sin el dominio C-terminal (CAT-3<sup>ΔTD</sup>), el dominio C-terminal de la CAT-3 (TDC3) y el gen de la chaperona Hsp31 de *E. coli*. Estos genes se clonaron en el plásmido pCold I para su expresión en *E. coli*. Se empleó este plásmido debido a que añade una etiqueta de 6xHis para su purificación por cromatografía de afinidad al níquel y utiliza un sistema de expresión en frío que favorece la traducción de la proteína de interés sobre las proteínas nativas. Todos los plásmidos se comprobaron por secuenciación para determinar que no tuvieran mutaciones y se estandarizaron las condiciones para su expresión y purificación (Figura 7 A-C).

La CAT-3 se expresó y purificó empleando el plásmido pCold/C3 reportado anteriormente en Nava-Ramírez, 2017. La CAT-1 se purificó a partir de los conidios del hongo. Para

obtener la CAT-1 sin el dominio C-terminal (C63) se digirió la enzima purificada con la proteasa subtilisina A y se eluyó del gel de poliacrilamida después de su separación por PAGE (Figura 7 D, E).



**Figura 7. Separación por electroforesis de las proteínas expresadas en *E. coli* y purificadas por afinidad al Ni de la etiqueta 6xHis y de la CAT-1 purificada de *N. crassa*.** A) CAT-3<sup>ATD</sup> (65 kDa) y su actividad en gel. B) SDS-PAGE de la TDC3 (19 kDa), la actividad de la CAT-3 y la ausencia de actividad de catalasa del péptido. C) Hsp31 (33 kDa). D) CAT-3 (80 kDa) y su actividad en gel. E) CAT-1 (80 kDa) purificada de *N. crassa* y el C63 (63 kDa) y la actividad en el gel. En todos los paneles el gel de la izquierda corresponde al SDS-PAGE y el gel de la actividad a la derecha se corrió en condiciones nativas.

## 2.2. Protección de la alcohol deshidrogenasa de la desnaturalización en presencia de una catalasa de subunidad grande o de su dominio C-terminal

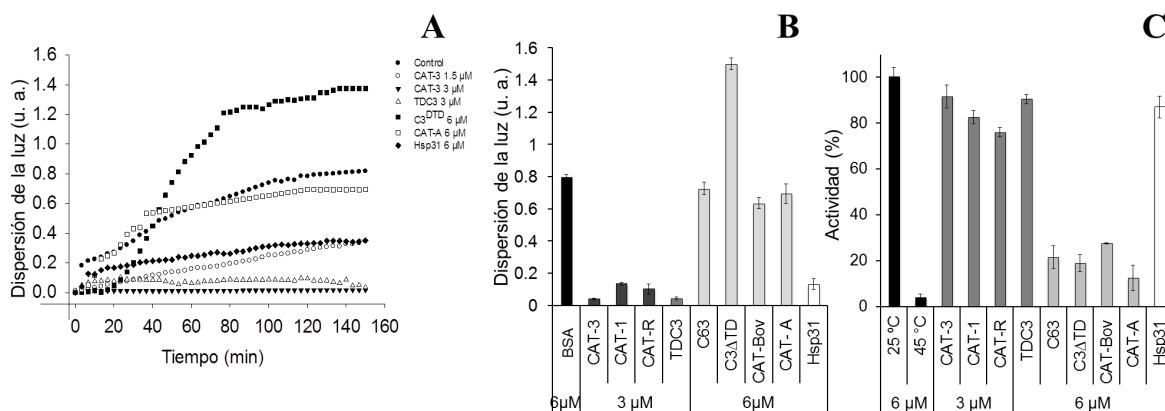
Para determinar la actividad de chaperona *in vitro* de las LSC se emplearon las LSC CAT-1, CAT-3 y CAT-R; el TDC3, las LSC sin dominio C-terminal C63 y CAT-3<sup>ATD</sup> y las SSC

CAT-A y CAT-Bov. Se usaron diferentes ensayos de chaperona donde se desnaturalizaron diferentes proteínas con calor, 8M de urea o por oxidación con 500  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como control positivo se empleó la chaperona Hsp31 y como negativo la albúmina de suero bovino (BSA). En estos ensayos se lee por espectrofotometría la dispersión de la luz a 360 nm provocada por la desnaturalización y la subsecuente agregación de las proteínas. Como sustratos se usaron las enzimas comerciales alcohol deshidrogenasa de *S. cerevisiae* (ADH), y para corroborar que la protección contra la desnaturalización no es específica se emplearon también la citrato sintasa de puerco (CS) y la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* ( $\beta$ -gal) (datos de estas últimas dos enzimas en el Apéndice I.3, ya que solo se realizaron con una sola condición de desnaturalización). En cada ensayo se midió posteriormente la actividad residual de la enzima sustrato para determinar el porcentaje de actividad conservado.

### **2.2.1. Protección contra la desnaturalización con calor**

La ADH muestra un proceso de desnaturalización al ser incubada a 45 °C, lo cual puede ser medido por el incremento de la señal de la dispersión de la luz. Se puede observar una protección de la desnaturalización de la ADH en presencia de la CAT-1, la CAT-3 y la CAT-R (Figura 8 A, B) que es proporcional a la concentración empleada de estas catalasas (Nava-Ramírez, 2017). Al emplear el dominio C-terminal de la CAT-3, TDC3, la protección contra la desnaturalización se mantiene y protege a la ADH de manera similar a la catalasa completa; en contraste, las catalasas que no cuentan con el dominio C-terminal, C63 y C3<sup>ATD</sup>, así como las SSC CAT-A y CAT-Bov, no protegen a la ADH de la desnaturalización. La Hsp31 (control positivo), como lo reportado, también protege a la ADH de la desnaturalización (Sastry, *et. al.* 2004), mientras que la BSA no lo hace (control negativo) (Figura 8 A, B).

Al medir la actividad de la ADH después de los diferentes ensayos, se observó que hay una correlación positiva entre la protección de la desnaturalización y el porcentaje de actividad conservado de la enzima. Las LSC y el TDC3 conservan entre un 90 y 80% de la actividad de la ADH, mientras que las sin dominio C-terminal y las SSC solo llegan a conservar un 20% de la actividad (Figura 8 C).



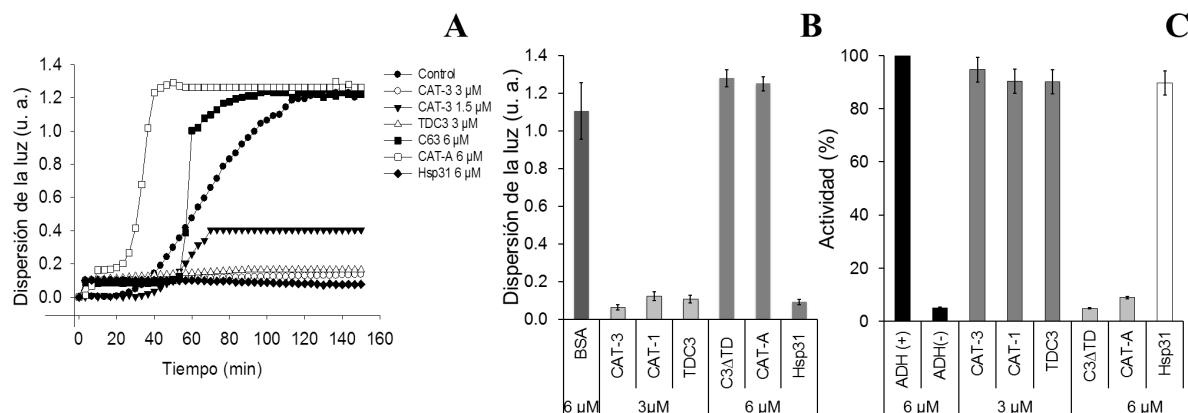
**Figura 8. Protección de la ADH contra la desnaturalización a 45 °C.** A) Dispersión de la luz (u. a. unidades arbitrarias) generada por la agregación de la ADH a 45 °C. En presencia de la CAT-3 de *N. crassa* 1.5  $\mu$ M (círculos vacíos) y 3  $\mu$ M (triángulos invertidos rellenos), del TDC3 6  $\mu$ M (triángulos vacíos), de la CAT-A 6  $\mu$ M (cuadrados vacíos) o de la CAT-3<sup>ATD</sup> 6  $\mu$ M (cuadrados rellenos). El control negativo se realizó con albúmina 6  $\mu$ M (BSA) (círculos rellenos) y el positivo con Hsp31 6  $\mu$ M (rombos rellenos). B) Promedio del valor final de dispersión de la luz de tres experimentos independientes. C) Porcentaje de actividad de la ADH después del ensayo de chaperona, promedio de tres experimentos independientes.

### 2.2.2. Protección contra la desnaturalización con 8 M de urea

La ADH se desdobra en presencia de urea 8 M, proceso que se puede seguir en el tiempo mediante un aumento en la dispersión de la luz. En presencia de la CAT-1, la CAT-3 y la CAT-R; el TDC3 (dominio C-terminal de la CAT-3) y la chaperona Hsp31 se observa una baja señal de la dispersión de la luz, indicando la protección de la ADH a la desnaturalización; en contraste, en presencia de las SSC y las LSC sin el dominio C-terminal no se observa esta protección, presentado una señal similar al control con BSA (Figura 9 A, B).

Similar a lo observado con la desnaturalización de la ADH a 45 °C, se observa una correlación positiva entre el porcentaje de actividad conservado al final de los ensayos y el nivel de protección de la desnaturalización. Las LSC y el TDC3 conservan entre un 95 y

85% de la actividad de la ADH, mientras que la C63 solo conserva un 10% de la actividad (Figura 9 C).



**Figura 9. Protección de la ADH contra la desnaturalización con 8 M de urea.**

A) Dispersión de la luz (u. a.) generada por el desdoblamiento de la ADH con 8 M de urea a 25 °C. En presencia de la CAT-3 a 0.25  $\mu$ M (círculos vacíos) y 0.5  $\mu$ M (triángulos invertidos rellenos), del TDC3 0.5  $\mu$ M (triángulos vacíos), de la CAT-A 0.5  $\mu$ M (cuadrados vacíos) o de la CAT-3<sup>ATD</sup> 0.5  $\mu$ M (cuadrados rellenos). El control negativo se realizó con 0.5  $\mu$ M de BSA (círculos rellenos) y el positivo con 0.5  $\mu$ M de Hsp31 (rombos rellenos). B) Promedio del valor final de dispersión de la luz de tres experimentos independientes. C) Porcentaje de actividad de la ADH después del ensayo de chaperona, promedio de tres experimentos independientes.

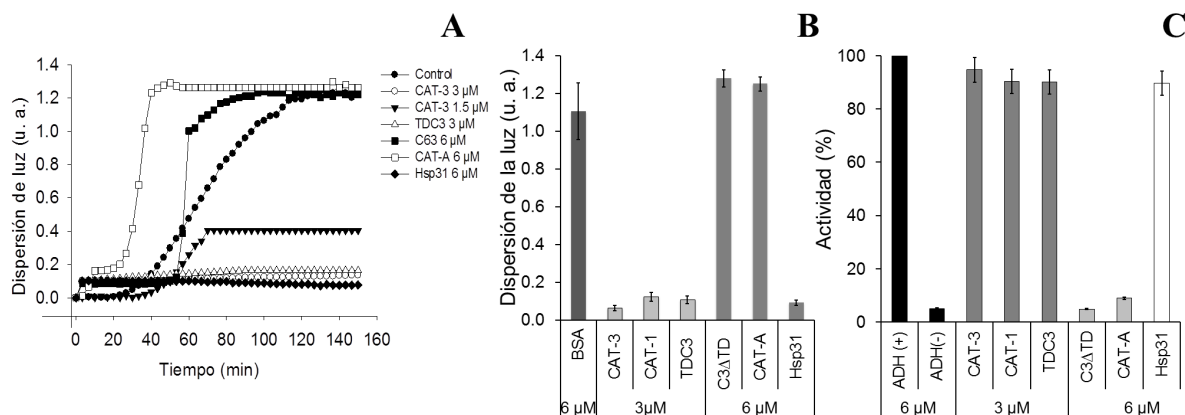
### 2.2.3. Protección contra la desnaturalización por oxidación con peróxido de hidrógeno

Se estandarizaron las condiciones para la desnaturalización de la ADH por oxidación, para lo cual se empleó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500  $\mu$ M. Se empleó una concentración alta según lo reportado en Men & Wang (2007) y se midió la dispersión de la luz generada por la desnaturalización de la enzima en el tiempo. Para evitar la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la actividad de catalasa, las catalasas empleadas en este ensayo se inhibieron irreversiblemente con azida de sodio.

Se observó que la CAT-1, la CAT-3, el dominio C-terminal TDC3 y la chaperona Hsp31 protegen la ADH de la desnaturalización por oxidación. Las SSC y las LSC sin el dominio



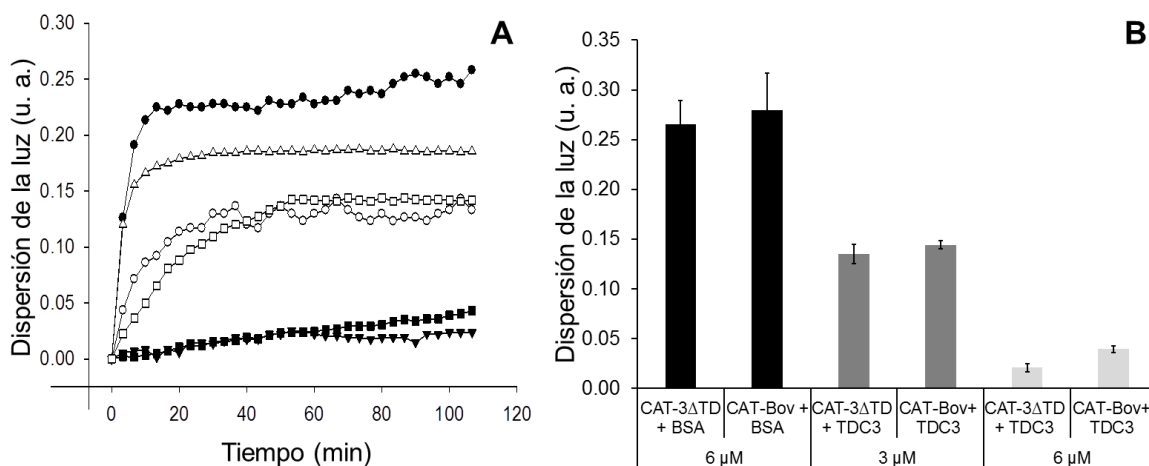
C-terminal no protegen (Figura 10 A, B). Como lo observado en los ensayos anteriores, el porcentaje de actividad conservado por la ADH al final de cada ensayo tiene una correlación positiva con la protección observada. La CAT-1, la CAT-3 y el TDC3 conservan hasta en un 90% la actividad de la enzima, mientras que las SSC y las LSC sin el dominio C-terminal solo conservan menos del 10% (Figura 10 C).



**Figura 10. Protección de la ADH contra la desnaturalización por oxidación con  $H_2O_2$ .** A) Dispersión de la luz (u. a.) generada por el desdoblamiento de la ADH con 500 μM de  $H_2O_2$  a 25 °C. En presencia de la CAT-3 1.5 μM (triángulos invertidos rellenos) y 3 μM (círculos vacíos), del TDC3 6 μM (triángulos vacíos), de la CAT-A (cuadrados vacíos) o de la CAT-3<sup>ΔTD</sup> (cuadrados rellenos). Todas las catalasas se inactivaron con 3 μM de azida de sodio. El control negativo se realizó con BSA 6 μM (rombos rellenos) y el control positivo con Hsp31 6 μM (rombos vacíos). B) Promedio del valor final de dispersión de la luz de tres experimentos independientes. C) Porcentaje de actividad de la ADH después del ensayo de chaperona, promedio de tres experimentos independientes.

### 2.3. El dominio C-terminal de la catalasa-3 protege al dominio catalítico y a la catalasa de bovino contra la desnaturalización

Se realizó un ensayo de chaperona usando como sustrato la CAT-3<sup>ΔTD</sup> y la CAT-Bov. Estas enzimas se desnaturalizaron incubando a 55 °C. Se observó que el TDC3 protege a estas enzimas de la desnaturalización con calor de manera dependiente de la concentración (Figura 11 A, B).



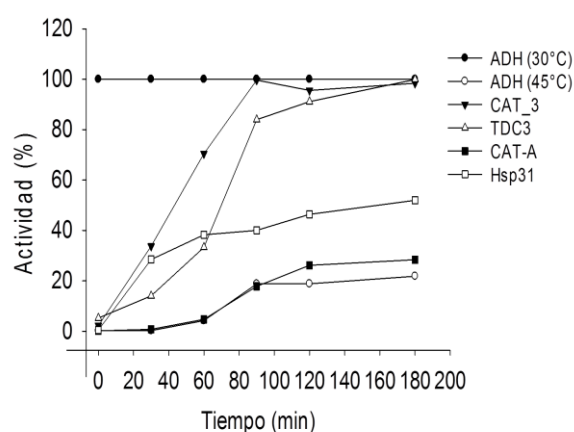
**Figura 11. Protección de la CAT-Bov y la CAT-3<sup>ΔTD</sup> de la desnaturalización con calor en presencia del dominio TDC3.** A) Dispersión de la luz de dos catalasas al ser incubadas a 55 °C. Como control se usó 6 μM de BSA con 6 μM de CAT-3<sup>ΔTD</sup> (círculos rellenos) y 6 μM CAT-Bov (triángulos vacíos). Se empleó TDC3 a 3 y 6 μM en presencia de CAT-3<sup>ΔTD</sup> 6 μM (círculos vacíos y triángulos rellenos respectivamente) y en presencia de CAT-Bov 6 μM (cuadrados vacíos y rellenos respectivamente). B) Promedio del valor final de dispersión de la luz de tres experimentos independientes.

#### 2.4. Las catalasas de subunidad grande y su dominio C-terminal ayudan a recuperar la actividad de la alcohol deshidrogenasa después de la desnaturalización

La chaperona Hsp31 de *E. coli* contribuye a disminuir el tiempo de recuperación de la estructura nativa de las proteínas parcial o completamente desnaturalizadas a las que se une, ayudando a recuperar con ello la actividad de las proteínas sustrato de manera independiente del ATP (Malki *et al.*, 2003; Sastry *et al.*, 2002). Empleando un ensayo de recuperación de la actividad de la ADH, se determinó si el dominio C-terminal de las LSC puede contribuir también a la recuperación de la estructura nativa.

La ADH se desnaturalizó al incubarla a 45°C por 2.5 h, tiempo en el que se observó la pérdida casi total de la actividad (Figura 8 C), posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 0, 30, 60, 120 y 180 min, en presencia de las diferentes chaperonas a la concentración que protege casi totalmente otras proteínas de la desnaturalización (Figura

12). Se observó que la ADH por sí misma puede recuperar hasta un 20% de su actividad al ser incubada 90 min y se mantiene este porcentaje incluso después de ser incubada por 180 min. La Hsp31 recupera la actividad de la ADH un 35% desde los 30 min de incubación y 50% después de 60 min. La CAT-3 y la TDC3 contribuyen a la recuperación de la actividad de manera más eficiente que la chaperona Hsp31, ya que pueden recuperar el 100% de la actividad después de ser incubadas por 90 min con CAT-3 y después de 120 min con TDC3. En cambio, la recuperación de la actividad de la SSC CAT-A es similar a la de la ADH sola (Figura 12).



**Figura 12. Ensayo de recuperación de la actividad de la ADH.** La ADH 6  $\mu\text{M}$  se desnaturalizó al ser incubada a 45°C por 2.5 h. Posteriormente se incubó diferentes tiempos 0, 30, 60, 90, 120 y 180 min a temperatura ambiente en ausencia (círculos vacíos) o presencia de las chaperonas en las concentraciones empleadas anteriormente: Hsp31 6  $\mu\text{M}$  (cuadrados vacíos), CAT-3 3  $\mu\text{M}$  (triángulos invertidos rellenos), TDC3 6  $\mu\text{M}$  (triángulos vacíos) y CAT-A 6  $\mu\text{M}$  (cuadrados rellenos) y después se midió la actividad de la ADH. Como control se empleó la ADH 6  $\mu\text{M}$  sin desnaturalizar (círculos rellenos) incubada a temperatura ambiente por los diferentes tiempos.

### 3. Determinación del mecanismo de acción de la actividad de chaperona de las catalasas de subunidad grande

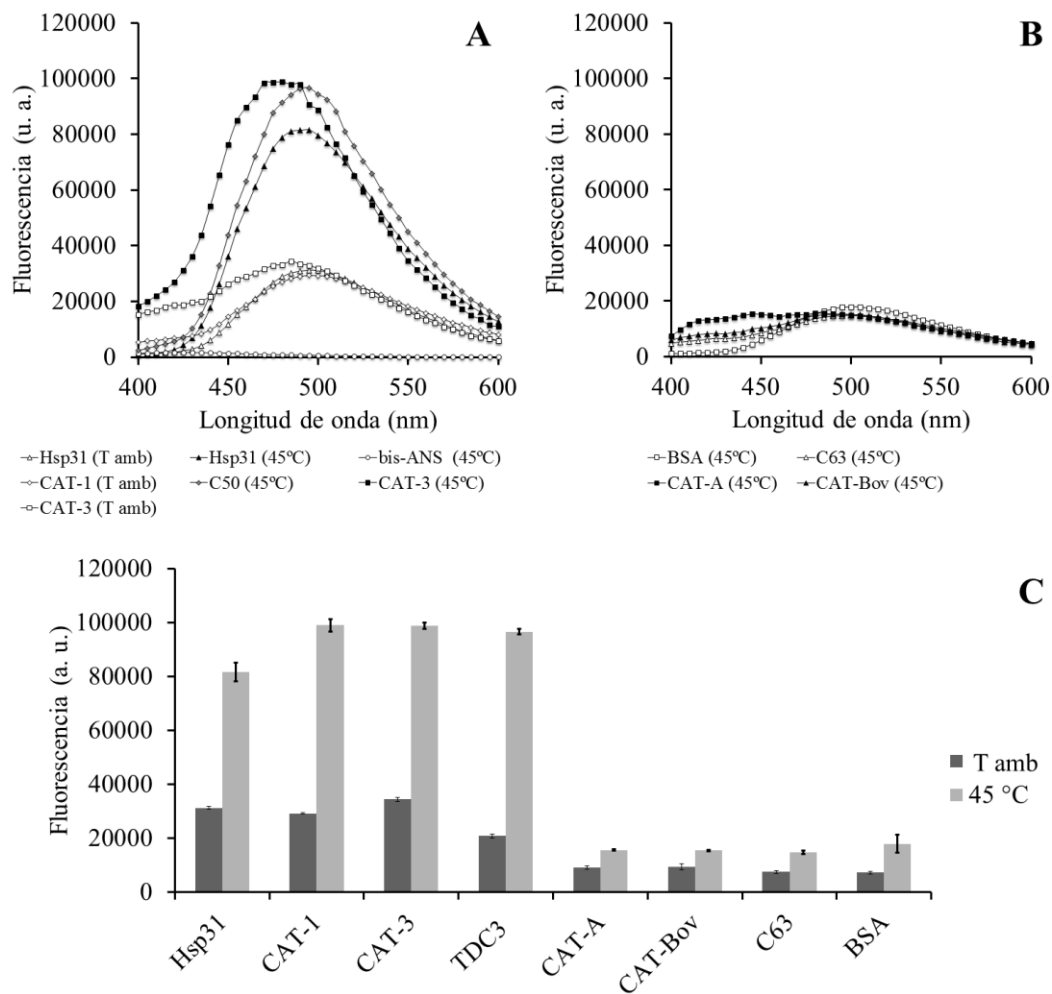
Las chaperonas pequeñas independientes de ATP tienen en esencia el mismo mecanismo de acción a pesar de su gran diversidad estructural. Este se basa en la

unión de superficies hidrófobas flexibles con las superficies hidrófobas expuestas de la proteína sustrato, junto con interacciones electrostáticas para estabilizar la interacción (Nava-Ramírez & Hansberg, 2020a). Por ello, para determinar el mecanismo de acción de la actividad de chaperona del dominio C-terminal, se evaluó si éste tiene zonas hidrofóbicas en la superficie, así como la participación de éstas y de interacciones electrostáticas en dicha actividad.

### **3.1. Importancia de las zonas hidrofóbicas en la superficie de la proteína para la actividad de chaperona de las catalasas de subunidad grande**

Para elucidar el mecanismo de interacción con las proteínas parcialmente desnaturalizadas, se determinó si había exposición de zonas hidrofóbicas en la superficie del dominio C-terminal como se ha mostrado para la chaperona Hsp31 en *E.coli* (Sastry *et al.*, 2002). Se realizó un ensayo con la sonda bis-ANS que se une de manera específica a las cavidades hidrofóbicas de las proteínas generando un incremento en su señal de fluorescencia (Hawe *et al.*, 2008; Oshinbolu *et al.*, 2018).

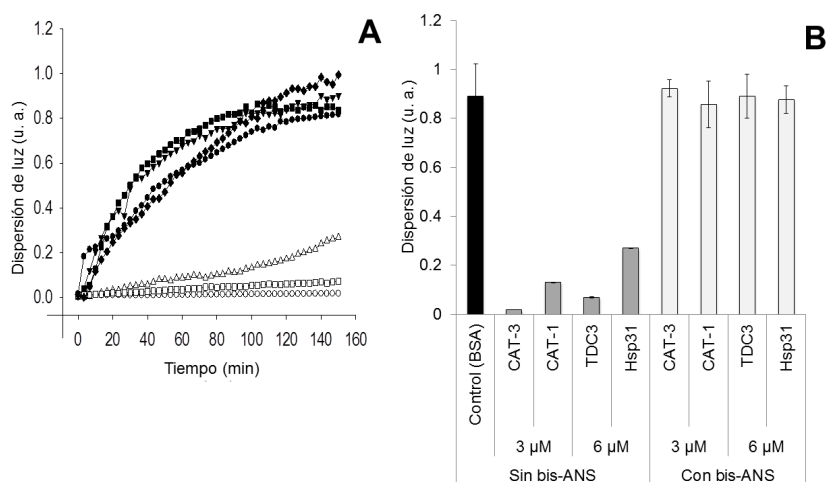
Se observó que la CAT-1, la CAT-3 y el TDC3, así como la chaperona Hsp31 presentan una señal de fluorescencia mayor a temperatura ambiente que las SSC (CAT-A y CAT-Bov), la C63 y la BSA, lo cual indica que presentan una mayor hidrofobicidad en su superficie. Al incubar las proteínas con la sonda a 45°C por 30 min se observó un incremento en la señal de la sonda con la chaperona Hsp31, con las LSC y con el TDC3, siendo ligeramente mayor la señal en el caso de estas últimas. La C63 y las SSC no presentaron un aumento significativo en la señal después de su incubación a 45 °C (Figura 13 A-C).



**Figura 13. Fluorescencia de la sonda bis-ANS cuando se une a las zonas hidrofóbicas que se exponen en la superficie de las proteínas.** A) Espectro de fluorescencia emitido por la sonda bis-ANS por sí sola (círculos vacíos) y al ser incubada con las diferentes proteínas, 30 minutos a temperatura ambiente o a 45 °C: Hsp31 (triángulos vacíos y rellenos respectivamente), CAT-3 (cuadrados vacíos y rellenos respectivamente) y TDC3 (rombos vacíos y rellenos respectivamente). B) Espectro de fluorescencia de la sonda bis-ANS al ser incubada con las diferentes proteínas, 30 minutos a temperatura ambiente o a 45 °C: CAT-A (cuadrados vacíos y rellenos respectivamente) y BSA (triángulos vacíos y rellenos respectivamente). C) Porcentaje del pico máximo de fluorescencia de tres experimentos independientes, a temperatura ambiente (gris oscuro) y después de su incubación a 45 °C (gris claro). Las diferentes proteínas se usaron a una concentración de 0.8  $\mu$ M como dímeros o tetrámeros, según se usó previamente, y la sonda bis-ANS a 1.2  $\mu$ M.

Se realizó un ensayo de inhibición de la actividad de chaperona empleando la sonda bis-ANS la cual, al ser expuesta a la luz UV, genera un enlace covalente con algún aminoácido cercano cargado positivamente. Este tipo de ensayo se ha empleado en varios estudios para la inhibición de la actividad de chaperona, así como para identificar las zonas de interacción de las proteínas parcialmente desnaturalizadas con las chaperonas (Jiao *et al.*, 2008; Sastry *et al.*, 2002; Seale *et al.*, 1995).

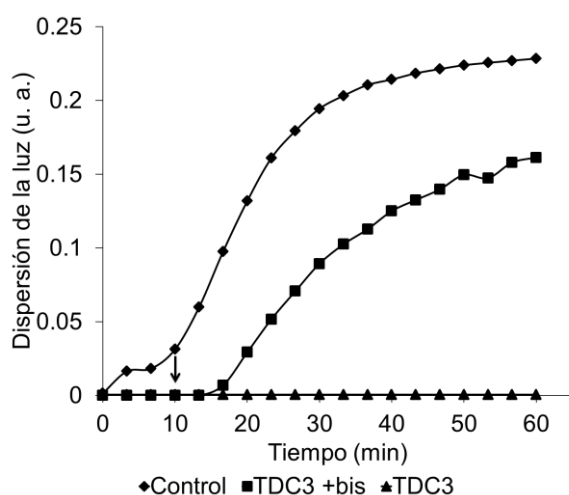
Las proteínas Hsp31, la CAT-3, la CAT-1 y el TDC3 se incubaron 30 min a 45 °C con la sonda bis-ANS y posteriormente se expusieron a la luz UV (366 nm) por 10 min a temperatura ambiente. Se observó que después de irradiar las proteínas se inhibe la protección de la ADH cuando se desnaturaliza a 45 °C, ya que en todos los casos se observa un aumento en la dispersión de luz que es parecido al control con BSA (Figura 14 A, B).



**Figura 14. Inhibición de la actividad de chaperona por foto-incorporación de la sonda bis-ANS.** A) Dispersión de la luz de la ADH 6 μM a 45 °C por 150 min en presencia de BSA 6 μM (círculos rellenos), de la CAT-3 3 μM, sin y con tratamiento con la sonda bis-ANS (círculos vacíos y triángulos rellenos respectivamente), del TDC3 6 μM, sin y con tratamiento (círculos vacíos y rombos rellenos respectivamente) y de la Hsp31 6 μM, sin y con tratamiento (triángulos vacíos y cuadrados rellenos respectivamente). B) Promedio del valor final de dispersión de la luz de tres experimentos independientes. Se empleó la sonda bis-ANS a una concentración de 12 μM. Después de incubar por 30 minutos a 45 °C

con la sonda bis-ANS, las proteínas se expusieron a 366 nm por 10 minutos a temperatura ambiente para favorecer la foto-incorporación de la sonda.

Para determinar si la sonda bis-ANS inhibe la actividad de chaperona, se incubó la ADH a 45 °C en presencia del TDC3, añadiendo el bis-ANS a los 10 min de iniciada la incubación. Se observó que el TDC3 deja de proteger a la ADH de la desnaturalización después de añadir la sonda a la celda, aunque el aumento en la dispersión de la luz es más lento que en el control (Figura 15).



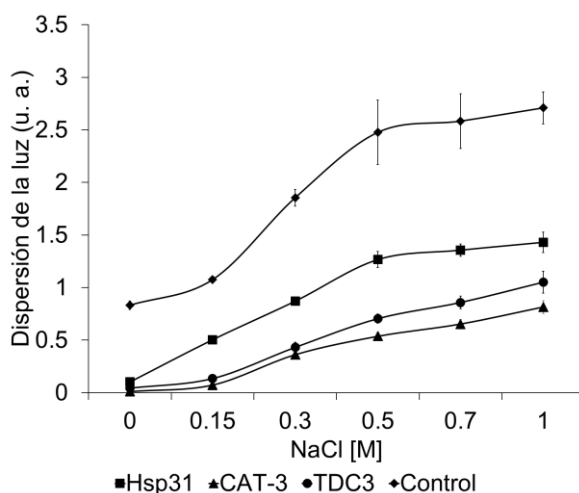
**Figura 15. El TDC3 y la sonda bis-ANS interaccionan con la misma zona de la ADH parcialmente desnaturalizada.** Dispersión de la luz de la ADH 6  $\mu$ M a 45 °C por 150 min en presencia de BSA 6  $\mu$ M (rombos), en presencia de TDC3 6  $\mu$ M (triángulos) o en presencia de TDC3 6  $\mu$ M pero agregando 12  $\mu$ M de la sonda bis-ANS 10 minutos después de iniciada la lectura (indicado con la flecha) (cuadrados). Para evitar la foto-incorporación de la sonda bis-ANS, en este ensayo se leyó la dispersión de la luz a 500 nm.

### 3.2. Importancia de las interacciones electrostáticas en la actividad de chaperona de las catalasas de subunidad grande

Las interacciones electrostáticas contribuyen de manera importante en la actividad de chaperona de algunas enzimas, como es el caso de Spy ( Lee *et al.*, 2018). Para determinar la contribución de las interacciones electrostáticas en la actividad de chaperona de las LSC se empleó el ensayo de protección de la desnaturalización de la ADH a 45 °C aumentando

progresivamente la fuerza iónica del amortiguador al añadir diferentes concentraciones de NaCl. Además, se realizó un ensayo de protección contra la desnaturalización de la ADH a 45 °C usando diferentes valores de pH, aunque no se observó diferencias significativas (ver Apéndice I.4).

Se observó que, al aumentar la fuerza iónica del amortiguador, la Hsp31, la CAT-3 y el TDC3 comienzan a perder la capacidad de proteger a la ADH de la desnaturalización. La Hsp31 comienza a perder la capacidad de protección a partir de 0.15 M, llegando a una meseta a los 0.5 M de NaCl, perdiendo un 50% de protección; la CAT-3 y el TDC3 se comportan de manera similar, empezando a perder la capacidad de protección a partir de 0.3 M, perdiendo un 35% de protección a 1 M de NaCl (Figura 16).



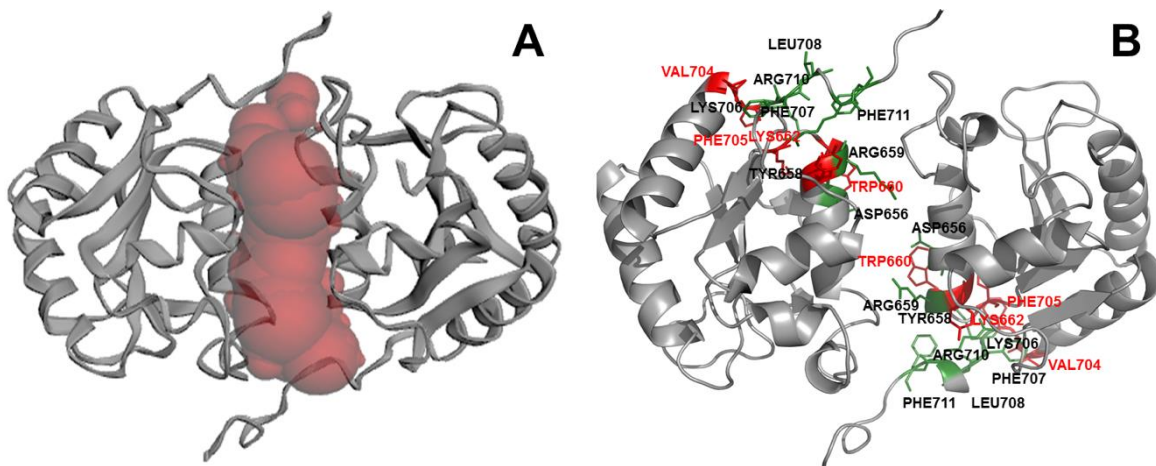
**Figura 16. El aumento en la fuerza iónica del medio afecta la actividad de chaperona de la CAT-3 y del dominio TDC3.** Dispersión de la luz a 360 nm de la ADH 6  $\mu$ M a 45 °C por 150 min en presencia de BSA 6  $\mu$ M (rombos), de Hsp31 6  $\mu$ M (cuadrados), de CAT-3 3  $\mu$ M (triángulos) o de TDC3 6  $\mu$ M (círculos) en diferentes concentraciones de NaCl (0, 0.15, 0.3, 0.7 y 1 M) en el amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0. Promedio del valor final de dispersión de la luz de tres experimentos independientes.



### 3.3. Determinación de la zona de interacción con las proteínas parcialmente desnaturalizadas

#### 3.3.1. Predicción de las zonas de interacción

Para determinar la zona de interacción de las proteínas parcialmente desnaturalizadas con el dominio TDC3 se emplearon dos servidores: el servidor CASTp3.0 para predecir las cavidades en su estructura y el servidor InterProSurf para predecir los posibles residuos de interacción con otras proteínas, dependiendo de la accesibilidad al solvente. Se observó que la cavidad en la interfaz del dímero es la de mayor tamaño presentando un área de  $381.695 \text{ \AA}^2$  y un volumen de  $184.653 \text{ \AA}^3$ , siendo la zona más probable de interacción con las proteínas parcialmente desnaturalizadas (Figura 17 A). Los residuos con mayor probabilidad de interacción con otras proteínas se encuentran en la región cercana al extremo carboxilo del dominio C-terminal y en los extremos de la cavidad, siendo los aminoácidos con mayor probabilidad de interacción W660, K662, V704, F705 y con una probabilidad media de interacción D656, Y658, R659, K706, F707, R710, F711 (Figura 17 B).

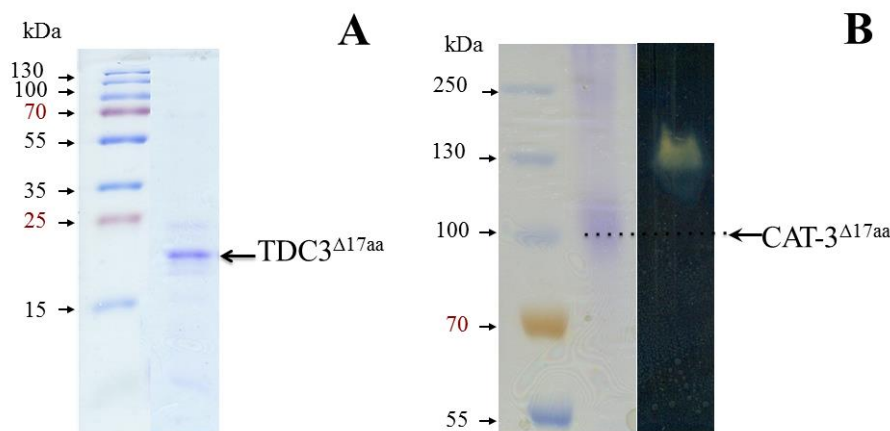


**Figura 17. Predicción de las cavidades y de la posible zona de interacción del dominio TDC3 con otras proteínas.** A) Predicción de las cavidades en la estructura del dímero TDC3, en rojo la cavidad predicha presenta un área de  $381.695 \text{ \AA}^2$  y un volumen de  $184.653 \text{ \AA}^3$  en la interfaz de la unión de los monómeros del TDC3. B) Predicción de las zonas de interacción con otras proteínas del dominio TDC3, se marcan en rojo los aminoácidos con mayor probabilidad de interacción (W660, K662,

V704, F705) y en verde los de probabilidad media (D656, Y658, R659, K706, F707, R710, F711).

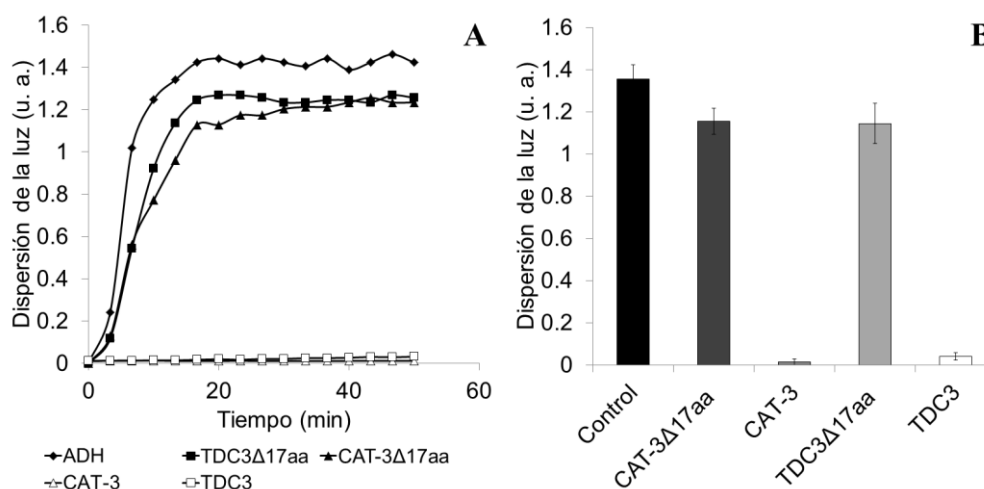
### 3.3.2. Pérdida de la actividad de chaperona con la eliminación de los últimos 17 aminoácidos del extremo carboxilo del dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande

Para confirmar si la zona cercana al carboxilo terminal interacciona con las proteína sustrato, se eliminaron los últimos 17 aminoácidos correspondientes al asa del extremo carboxilo, que comprende 7 aminoácidos hidrofóbicos, 9 aminoácidos con carga y una glicina, de los cuales V704 y F705 tienen alta probabilidad de interacción y K706, F707, R710, F711 presentan una probabilidad media de interacción. Los plásmidos del TDC3 y de la CAT-3 sin los últimos 17 aminoácidos (TDC3 $\Delta$ 17aa y CAT-3 $\Delta$ 17aa) se expresaron en *E. coli* y se obtuvo los péptidos del tamaño esperado (Figura 15). La CAT-3 $\Delta$ 17aa conserva la actividad de catalasa en un zymograma (Figura 18 B).



**Figura 18. Separación por electroforesis de las proteínas sin los últimos 17 aminoácidos, expresadas en *E. coli*.** A) TDC3 $\Delta$ 17aa (18 kDa). B) CAT-3 $\Delta$ 17aa (81 kDa) y su actividad en el gel. En ambos paneles el gel de la izquierda corresponde al SDS-PAGE, el gen de la actividad del panel B corresponde al de la derecha y se corrió en condiciones nativas.

Se usaron estas dos proteínas en un ensayo de chaperona para determinar si protegen otras proteínas de la desnaturalización, como en el caso de sus variantes completas. Se observó que tanto la CAT-3 $\Delta 17aa$  como la TDC3 $\Delta 17aa$  perdieron casi completamente (85%) la capacidad de proteger a la ADH de la desnaturalización a 45 °C, mientras que la CAT-3 y el dominio TDC3 a la misma concentración, protegen casi al 100% en estas condiciones (Figura 19).



**Figura 19. La CAT-3 sin los últimos 17 aminoácidos pierde su actividad de chaperona.** A) Dispersión de la luz a 360 nm de la ADH 6  $\mu$ M a 55 °C por 150 min, con BSA 6  $\mu$ M como control (rombos). En presencia de la CAT-3 3  $\mu$ M (triángulos vacíos), del TDC3 6  $\mu$ M (cuadrados vacíos), de la CAT-3 $\Delta 17aa$  3  $\mu$ M (triángulos rellenos) o del TDC3 $\Delta 17aa$  6  $\mu$ M (cuadrados rellenos). B) Promedio del valor final de dispersión de la luz de tres experimentos independientes.

#### 4. Determinación de la función *in vivo* de la actividad de chaperona del dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande

##### 4.1. La sobreexpresión de la catalasa-3 o de su dominio C-terminal contribuye a la supervivencia de *E. coli* ante diferentes condiciones de estrés

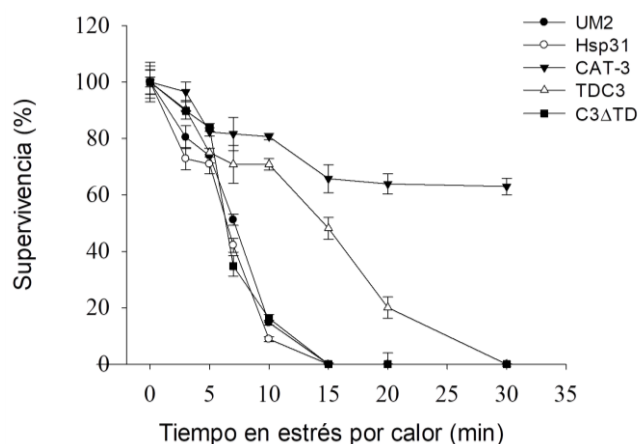
La expresión de algunas chaperonas favorece la supervivencia de *E. coli* en algunas condiciones de estrés (Chernova *et al.*, 2020; Mujacic & Baneyx, 2007; Takeuchi, 2006). Para determinar si la actividad de chaperona del dominio C-terminal de las LSC tiene una

función *in vivo*, se evaluó si la expresión del TDC3 o de la CAT-3 aumentan la supervivencia de *E. coli* ante el estrés por calor, el oxidante y el osmótico.

Se empleó para ello la cepa UM2 de *E. coli* que carece de los genes de las dos catalasas (la LSC HP11 es ortóloga de la CAT-1 de *N. crassa*). Se transformó esta cepa con los plásmidos para expresar Hsp31, CAT-3, TDC3 o CAT-3<sup>ΔTD</sup> respectivamente y como control se empleó la cepa sin transformación. Se utilizaron las mismas condiciones de expresión para las diferentes proteínas y posteriormente se sometieron a las diferentes condiciones de estrés. El crecimiento a 37 °C se siguió con un lector de placas midiendo la basorrbancia a 600 nm hasta alcanzar la fase estacionaria a las 48 h.

#### 4.1.1. Crecimiento de *E. coli* después de un estrés por calor

Se incubaron las diferentes cepas a 55 °C por diferentes tiempos (0, 10, 30 y 60 min) sin agitación y posteriormente se determinó el crecimiento después del estrés. Tanto la cepa que expresa CAT-3 como la que expresa el dominio TDC3 presentan el mismo crecimiento en todos los tiempos. La cepa que expresa Hsp31 crece menos (25%) después de ser incubada hasta por 30 min a 55 °C, pero deja de crecer después de los 60 min de incubación. La cepa UM2 sin plásmido o expresando sólo el dominio catalítico CAT-3<sup>ΔTD</sup> presentan una caída drástica del crecimiento después de los 10 min de incubación, un poco mayor en la última (Figura 20). A temperaturas menores de 55 °C no se observaron diferencias significativas entre la supervivencia de las cepas que expresan Hsp31, TDC3 y CAT-3.



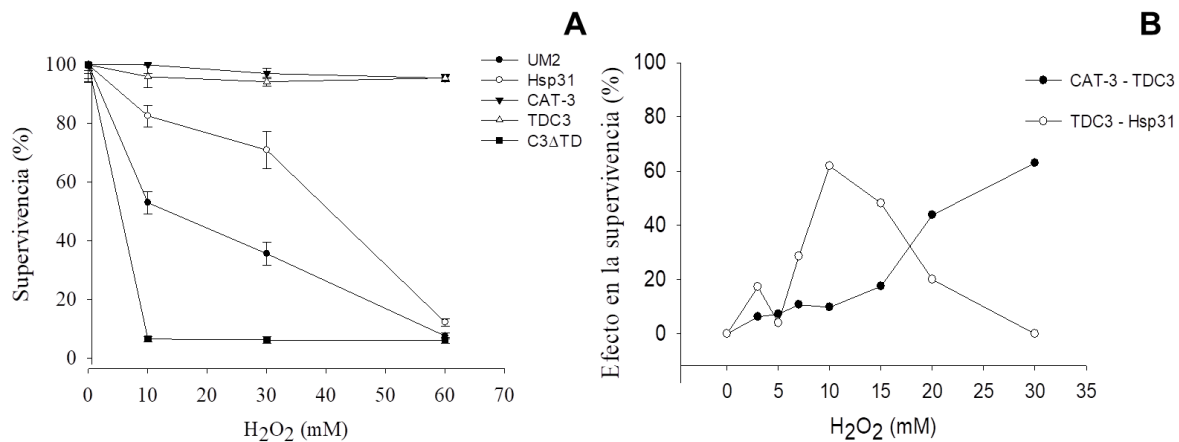
**Figura 20. Crecimiento de *E. coli* después de un estrés por calor cuando expresa una chaperona.** Crecimiento a las 48 h después de la incubación a 55 °C

por diferentes tiempos (0, 10, 30 y 60 min): Hsp31 (círculos vacíos), CAT-3 (triángulos rellenos), TDC3 (triángulos vacíos) y CAT-3<sup>ATD</sup> (cuadrados rellenos) y como control la cepa UM2 de *E. coli* (círculos rellenos).

#### 4.1.2. Crecimiento de *E. coli* después de un estrés oxidante

Debido a la importancia de la actividad de catalasa de las LSC para contender con el estrés oxidante en el hongo y a que éstas pueden proteger a otras proteínas de la desnaturalización por oxidación (Figura 10), se probó si la expresión de estas chaperonas podría favorecer la supervivencia de *E. coli* después de someterla al estrés oxidante. Después de la expresión de las proteínas, se incubaron las cepas con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 3, 5, 7, 10, 15, 20 y 30 mM) por 25 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las bacterias se diluyeron 30 veces en medio LB y se midió su crecimiento incubando a 37 °C. Con respecto al control sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se observó que la cepa que expresa CAT-3 crece un 80% con 10 mM y 65% con 30 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; la cepa que expresa el TDC3 crece un 70% con 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero pierde viabilidad paulatinamente a mayores concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y deja de crecer a 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las cepas Hsp31 y CAT-3<sup>ATD</sup> presentan una caída drástica de la viabilidad de 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en adelante que es similar a la cepa UM2, que no expresa ninguna chaperona (Figura 21 A).

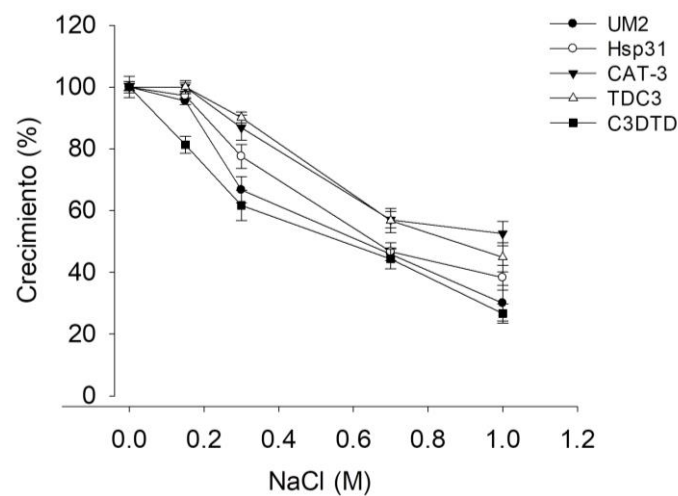
Debido a que en este ensayo no se puede inhibir la actividad de catalasa de la CAT-3 sin afectar las bacterias, se realizó una sustracción de los valores del TDC3 de los de la CAT-3, para hacer explícito sólo el efecto de la actividad de catalasa (sin el efecto de la chaperona). Se observa que la contribución de la actividad de catalasa al crecimiento es principalmente a concentraciones altas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20-35 mM). Para determinar el efecto de la actividad de chaperona de la CAT-3 se sustrajeron los valores de la curva de Hsp31 a los del TDC3. Se observa que el efecto de chaperona del TDC3 es mayor a concentraciones bajas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (7-15 mM) (Figura 21 B).



**Figura 21. Crecimiento de *E. coli* después de un estrés oxidante cuando expresa una chaperona.** A) Crecimiento a las 48 h después de la incubación por 25 min con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 3, 5, 7, 10, 15, 20 y 30 mM): Hsp31 (círculos vacíos), CAT-3 (triángulos rellenos), TDC3 (triángulos vacíos) y CAT-3<sup>ΔTD</sup> (cuadrados rellenos). Como control se empleó la cepa UM2 de *E. coli* (círculos rellenos). B) Efecto en el crecimiento de cada actividad de la CAT-3: la curva TDC3 se restó de la curva CAT-3 para mostrar el efecto de la actividad de catalasa (círculos rellenos), la curva Hsp31 se restó de la curva TDC3 para mostrar el efecto de la actividad de chaperona de la CAT-3 (círculos vacíos).

#### 4.1.3. Crecimiento de *E. coli* en estrés osmótico

Se crecieron las cepas en presencia de diferentes concentraciones de NaCl (0, 0.15, 0.3, 0.7 y 1 M) y se observó que todas se ven afectadas en su crecimiento sin haber grandes diferencias (Figura 22). Sin embargo, en comparación con el control, las cepas CAT-3 y TDC3 crecen mejor (90% vs 64% a 0.3 M y 50% vs 28% a 1 M) y la Hsp31 tiene un crecimiento intermedio (78% a 0.3 y 40% a 1 M).



**Figura 22. Crecimiento de *E. coli* durante un estrés osmótico cuando expresa una chaperona.** Porcentaje de crecimiento de las cepas de *E. coli* en presencia de diferentes concentraciones de NaCl (0, 0.15, 0.3, 0.7 y 1 M) por 24 h. Hsp31 (círculos vacíos), CAT-3 (triángulos rellenos), TDC3 (triángulos vacíos) y CAT-3<sup>ΔTD</sup> (cuadrados rellenos). Como control se empleó la cepa UM2 de *E. coli* (círculos rellenos).

## 4.2. La función fisiológica de la actividad de chaperona del dominio C-terminal de la catalasa-3 en el hongo *N. crassa*

### 4.2.1. Separación de los dos dominios de actividad, de catalasa y de chaperona, de la catalasa-3 etiquetados con proteínas fluorescentes

Para determinar la función fisiológica en el hongo de la actividad de chaperona de las LSC, se generaron mutantes de la CAT-3, separando el dominio con actividad de catalasa y el dominio con actividad de chaperona y cada dominio se etiquetó con una proteína fluorescente diferente. Estas mutantes se construyeron para observar la localización de la CAT-3 en condiciones fisiológicas en el hongo, así como la caracterización del fenotipo en condiciones con y sin estrés durante el crecimiento y la diferenciación celular en el proceso de la reproducción asexual.

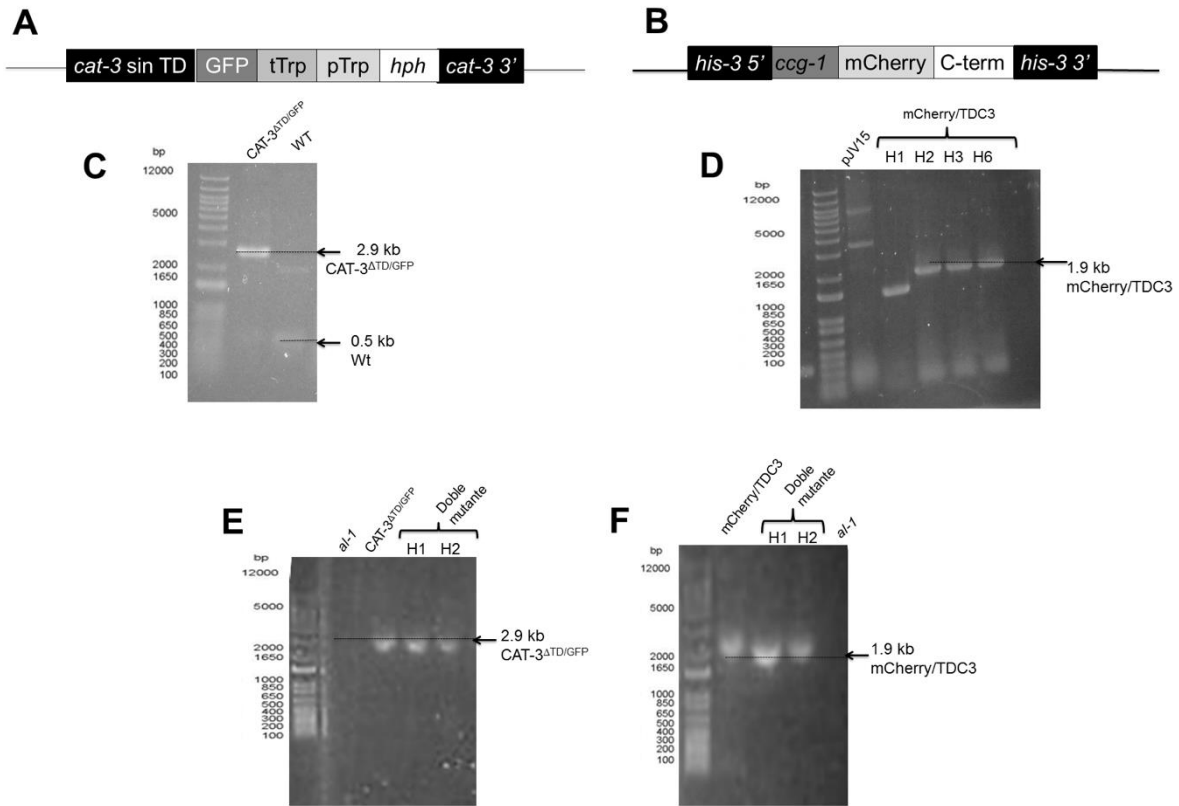
Para etiquetar el dominio con actividad de catalasa se empleó el gen *cat-3* sin la región del dominio C-terminal (del residuo de aminoácido 1 al 560, 1.7 kb) añadiendo en el extremo carboxilo la secuencia del gen de la proteína verde fluorescente (0.5 kb). Esta construcción

se diseñó para insertarse por recombinación homóloga en el locus *cat-3*. Como mecanismo de selección se añadió el marco de lectura abierto del gen que confiere la resistencia a higromicina (*hph*), expresado bajo el control del promotor del gen de *trpC* implicado en la biosíntesis del triptófano para conseguir una expresión constitutiva (Figura 23 A). Se insertó la construcción en el plásmido pCold I y se verificó por secuenciación que no presentara mutaciones. Con esta construcción se transformó la cepa  $\Delta al-1; \Delta mus-51$  y se verificó su inserción en *cat-3* por PCR de punto final (Figura 23 C). Se utilizó el fondo genético  $\Delta al-1$ , una mutante que no sintetiza carotenos, ya que producen fluorescencia, y  $\Delta mus-51$  para evitar la recombinación heteróloga. La cepa obtenida se denominó CAT-3<sup>ΔTD/GFP</sup>.

Para etiquetar el dominio con actividad de chaperona se empleó la región del gen *cat-3* correspondiente al dominio C-terminal (del residuo de aminoácido 568 al 719, 0.5 kb) y se le fusionó en el extremo amino la secuencia del gen de la proteína mCherry monomérica (1.4 kb). Se insertó esta construcción en el plásmido pJV15-2 (Ramírez Cota, 2010), río abajo del promotor *ccg-1*, que responde a la luz. Este plásmido contiene las secuencias necesarias para insertar por recombinación homóloga en el locus *his-3* (Figura 23 B). Se usó la cepa  $\Delta al-1; \Delta cat-3; \Delta mus-51; his3^-$  como fondo genético para seleccionar aquellas mutantes que complementaran la auxotrofia de histidina. El plásmido se secuenció para comprobar que no presentara mutaciones y con él se transformó el hongo; posteriormente, las mutantes seleccionadas se verificaron por PCR punto final (Figura 23 D). La cepa escogida se denominó mCherry/TDC3.

La cepa doble mutante se obtuvo a partir de la cruce sexual entre la cepa CAT-3<sup>ΔTD/GFP</sup> y la cepa mCherry/TDC3. Las mutantes dobles se seleccionaron por la resistencia a higromicina y por no presentar la auxotrofia a la histidina. Las cepas mutantes obtenidas se verificaron por PCR punto final para las dos construcciones (Figura 23 E, F).





**Figura 23. Construcciones para etiquetar los dos dominios de la CAT-3 con proteínas fluorescentes y la comprobación de las cepas por PCR.** A) Representación de la construcción del gen *cat-3* sin el dominio C-terminal (*cat-3* sin TD) etiquetada con la proteína verde fluorescente (GFP) en su extremo carboxilo. Se añadió el terminador del triptófano (tTrp) seguido del promotor del triptófano (pTrp) y el gen de la resistencia a higromicina (*hph*). Esta construcción se diseñó para insertarse en el locus del gen *cat-3* por recombinación homóloga, usando como las regiones de recombinación el gen sin el dominio C-terminal (1.7 kb) y una secuencia de 1.5 kb río abajo del gen. B) Representación de la construcción para etiquetar el dominio C-terminal de la CAT-3 (C-term) con la proteína mCherry en su extremo amino. Se le añadió el promotor *ccg-1* presente en el plásmido pJV15-2. Esta construcción se diseñó para insertarse en el locus *his3* usando las regiones *his3* 5' y *his3* 3' presentes en el plásmido pJV15-2. C) Comprobación por PCR de la cepa mutante CAT-3<sup>ΔTD/GFP</sup>. Se amplificó a partir del DNA genómico de la cepa mutante y la cepa WT la región del gen *cat-3* previa al dominio C-terminal y unas 100 pares de bases río abajo del gen que corresponden a 500 pb en el gen WT y a 2.9 kb si se insertó la construcción. D) Comprobación por

PCR de las cepas mutantes mCherry/TDC3. Se emplearon los oligonucleótidos específicos para amplificar el gen *mCherry* unido al dominio C-terminal de la CAT-3 con un tamaño de 1.9 kb, usando el DNA genómico de las cepas mutantes y la cepa WT. E) Comprobación por PCR de la presencia de la construcción CAT-3<sup>ΔTD/GFP</sup> en las cepas mutantes dobles obtenidas por cruce. Se usó para ello el DNA genómico de las cepas obtenidas por la cruce, la mutante CAT-3<sup>ΔTD/GFP</sup> y la cepa *Δal-1;Δmus-51* que se empleó como fondo genético para la mutante sencilla. F) Comprobación por PCR de la presencia de la construcción mCherry/TDC3 de las cepas mutantes dobles obtenidas por cruce sexual. Se usó para ello el DNA genómico de las cepas obtenidas por la cruce, la mutante mCherry/TDC3 y la cepa *Δal-1;Δcat-3;Δmus-51;his3<sup>-</sup>* que se empleó como fondo genético para la mutante sencilla.

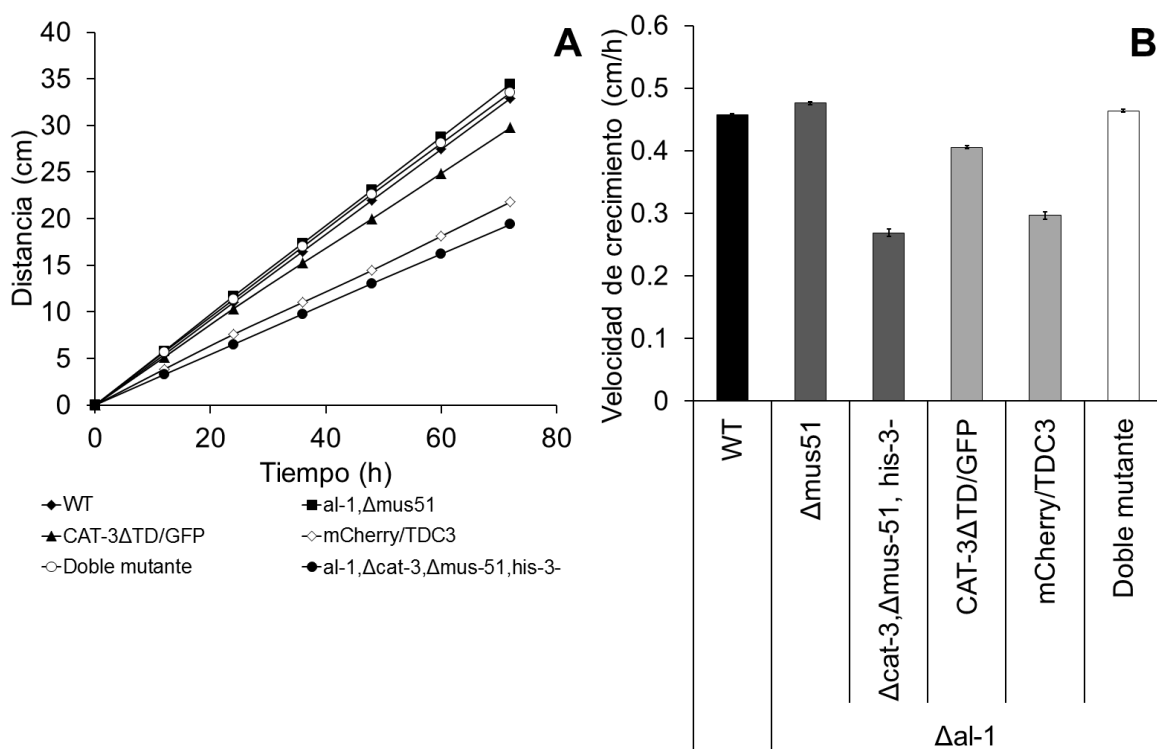
#### **4.2.2. Fenotipo de las cepas mutantes**

Para determinar la importancia fisiológica de cada actividad de la CAT-3 en el hongo se caracterizó el fenotipo de las cepas con las proteínas mutantes, la doble mutante y las cepas que sirvieron como fondo genético y la WT en condiciones de crecimiento y en estrés.

##### **4.2.2.1. Caracterización del fenotipo de las cepas en condiciones sin estrés**

El crecimiento de las distintas cepas en VS-agar a 30 °C se determinó en presencia de luz ambiental (Figura 24). Se observó que la cepas *Δal-1;Δmus-51* (usada como fondo genético para la cepa *Δal-1;CAT-3<sup>ΔTD/GFP</sup>*) presentó una velocidad de crecimiento similar a la cepa WT, mientras que la cepa *Δal-1;Δcat-3;Δmus-51;his3<sup>-</sup>* (usada como fondo genético para la cepa *Δal-1;mCherry/TDC3*) mostró una reducción de la velocidad de crecimiento del 41.3% con respecto a la cepa WT, indicando que la falta de la CAT-3 afecta el crecimiento. La cepa *Δal-1;CAT-3<sup>ΔTD/GFP</sup>* tiene un crecimiento de 11.4% menor que la WT, sugiriendo que la falta del dominio C-terminal de la CAT-3, que tiene actividad de chaperona, también afecta el crecimiento, pero menos que la falta de la CAT-3 completa. La cepa *Δal-1;mCherry/TDC3* tiene una reducción en la velocidad de crecimiento del 35.2% pero crece mejor que la cepa *Δal-1;Δcat-3;Δmus-51;his3<sup>-</sup>*, indicando que la actividad de chaperona del TDC3 mejora el crecimiento en comparación con la cepa sin

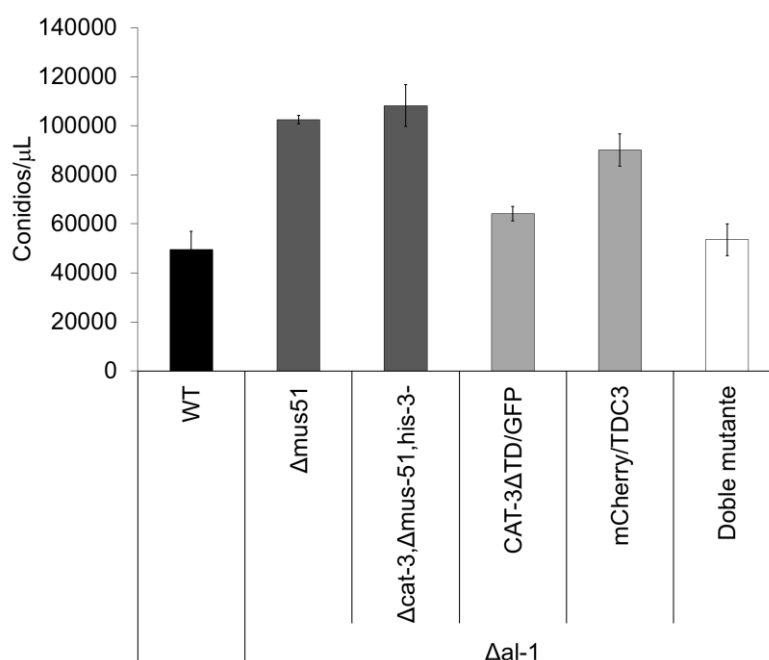
CAT-3. La  $\Delta al-1$ ;doble mutante presenta una velocidad de crecimiento igual que la cepa silvestre, mostrando que se requieren las dos actividades de la CAT-3 para reestablecer el crecimiento de la WT (Figura 24). El resultado muestra que la actividad de catalasa-3 es importante para el crecimiento. La actividad de chaperona también tiene un efecto sobre el crecimiento, pero menor al de la actividad de la catalasa. La cepa doble mutante se comporta de manera similar a la WT.



**Figura 24. Crecimiento de las diferentes cepas en condiciones sin estrés.** A) Curvas de crecimiento de las diferentes cepas en medio VS-agar a 30 °C. El crecimiento (distancia desde el origen en cm) se midió cada 12 horas durante tres días en tubos de pista, en donde el hongo solo crece en una dirección: WT (rombos rellenos),  $\Delta al-1; \Delta mus-51$  (cuadrados rellenos),  $\Delta al-1; \Delta cat-3; \Delta mus-51; his-3$  (círculos rellenos),  $\Delta al-1; CAT-3^{\Delta TD/GFP}$  (triángulos rellenos),  $\Delta al-1; mCherry/TDC3$  (rombos vacíos),  $\Delta al-1$ ;doble mutante (círculos vacíos). B) Velocidad del crecimiento en cm/h de las diferentes cepas. Las mediciones se realizaron por triplicado.

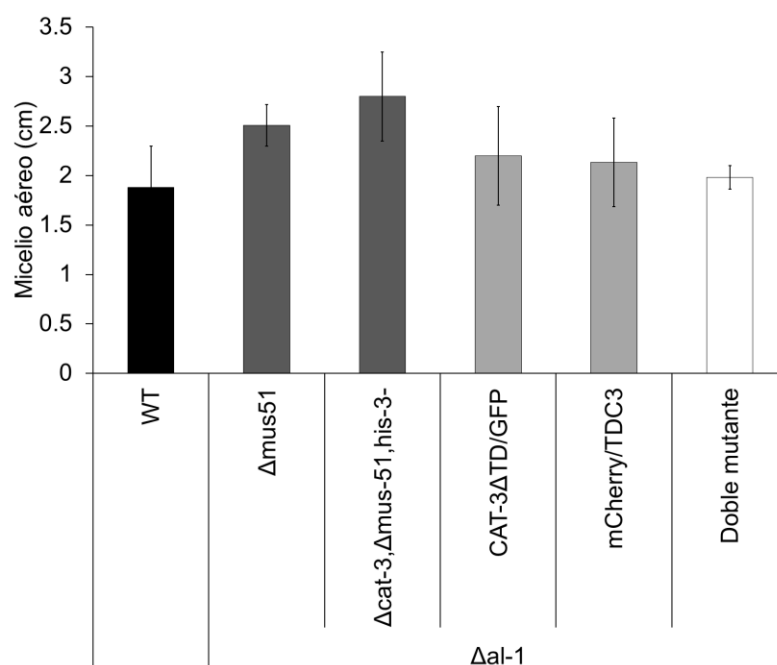
Para determinar si durante el proceso de conidiación en *N. crassa* la actividad de chaperona tiene importancia fisiológica, se caracterizó el fenotipo de las diferentes mutantes durante este proceso. Se evaluó la producción de conidios, de micelio aéreo y la germinación de los conidios de las diferentes mutantes en comparación con la cepa WT.

Para medir la producción de conidios se hicieron germinar  $1 \times 10^6$  conidios en tubos inclinados con medio VS-agar sin estrés durante cinco días. Los conidios producidos se suspendieron en agua y se contaron en una cámara de Neubauer (Figura 25). Se observó que la cepa  $\Delta al-1; \Delta mus-51$  produjo una cantidad de conidios similar a la cepa  $\Delta al-1; \Delta cat-3; \Delta mus-51; his3^-$  que generó más del doble de conidios que la WT. Tanto la mutación  $\Delta al-1$  como la mutación  $\Delta cat-3$  causa una mayor producción de conidios (Michán *et al.*, 2003), aunque el efecto no es aditivo. La mutante  $\Delta al-1; CAT-3^{\Delta TD/GFP}$  produce una menor cantidad de conidios que la cepa  $\Delta al-1; \Delta cat-3; \Delta mus-51; his3^-$ , indicando que la actividad de catalasa de la CAT-3 restituye casi por completo el fenotipo silvestre, ya que produce un 27% más conidios que la WT. La cepa  $\Delta al-1; mCherry/TDC3$ , que no tiene la actividad de catalasa-3 pero sí de chaperona, produce 81% más de conidios que la WT. La cepa  $\Delta al-1$ ; doble mutante, que tiene las dos actividades, produce solo un 7% más de conidios que la WT mostrando un fenotipo más parecido a ésta que las mutantes sencillas (Figura 25). El resultado muestra que la ausencia de actividad de catalasa-3 aumenta considerablemente la formación de conidios. La falta de actividad de chaperona también aumenta el número de conidios, pero menos que la ausencia de la actividad de la catalasa. La cepa mutante doble es similar a la WT.



**Figura 25. Conidiación de las diferentes cepas.** Número de conidios por  $\mu\text{L}$  producidos por las diferentes cepas en condiciones de crecimiento. Se crecieron  $1 \times 10^6$  conidios en tubos inclinados con medio VS-agar, se crecieron por tres días en oscuridad a  $30^\circ\text{C}$ , para inducir la conidiación posteriormente se incubaron por dos días en luz a  $25^\circ\text{C}$ . Cada barra es el promedio del resultado de siete experimentos independientes.

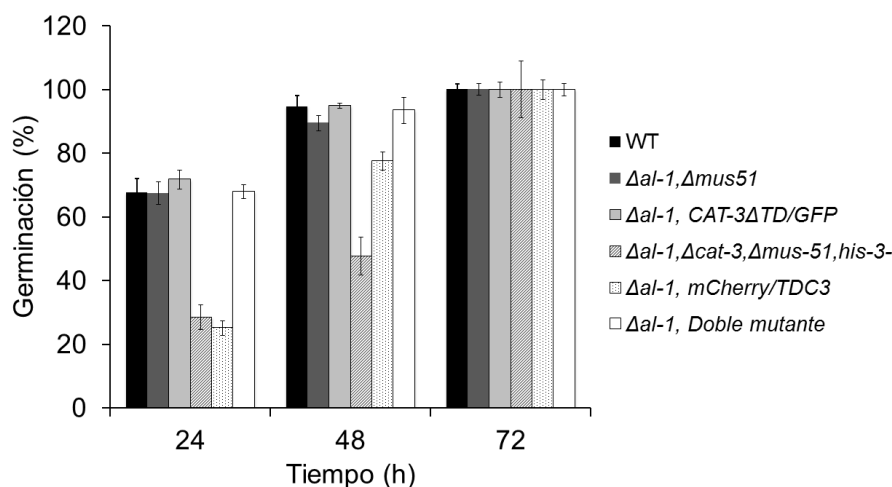
Se cuantificó la producción del micelio aéreo midiendo su altura en tubos de ensayo, sin estrés (Figura 26). Se observó que la cepa  $\Delta al-1; \Delta mus-51$  y la cepa  $\Delta al-1; \Delta cat-3; \Delta mus-51; his3^-$  producen un 33 y 38% más micelio aéreo que la cepa WT respectivamente, lo cual se explica por las mutaciones  $\Delta al-1$  y  $\Delta cat-3$  (Michán et al., 2003). Las mutantes  $\Delta al-1; CAT-3^{\Delta TD/GFP}$ ,  $\Delta al-1; mCherry/TDC3$  y la  $\Delta al-1$ ; doble mutante producen un 5-15% más micelio aéreo que la cepa silvestre. Sin embargo, debido a que la desviación estándar es grande faltaría hacer la comparación cuantificando la proteína total del micelio aéreo de cada cepa.



**Figura 26. Producción del micelio aéreo de las diferentes cepas.** Altura del micelio aéreo formado por las diferentes cepas en tubos de ensaye de 20 x 1.5 cm. El hongo se hizo crecer a partir de  $1 \times 10^6$  conidios en medio VS-agar, con una relación 1:3 aire/medio, durante tres días en oscuridad a 30 °C y posteriormente durante dos días en luz a 25 °C. Cada barra es el promedio del resultado de tres experimentos independientes.

Para determinar el porcentaje de germinación se inocularon 200 conidios en medio de colonia aislada en una caja Petri, se dispersaron y se contaron las colonias germinadas cada 24 h (Figura 27). Se observó que las cepas WT,  $\Delta\text{al-1};\Delta\text{mus-51}$ ,  $\Delta\text{al-1};\text{CAT-3}^{\Delta\text{TD/GFP}}$  y la  $\Delta\text{al-1}$ ;doble mutante, germinan alrededor del 70% de los conidios durante las primeras 24 h y alrededor de 94% a las 48 h. Las cuatro cepas tienen actividad de catalasa-3 y también de chaperona a excepción de la CAT-3 $\Delta\text{TD/GFP}$ . La cepa  $\Delta\text{al-1};\Delta\text{cat-3};\Delta\text{mus-51};\text{his3}^-$  presenta un retraso en la germinación, ya que solo el 29% de los conidios germinan durante las primeras 24 h y un 48% a las 48 h. Esta cepa carece tanto de actividad de catalasa-3 como de chaperona. La cepa mutante  $\Delta\text{al-1};\text{mCherry/TDC3}$  también presenta un retraso en la germinación aunque menor que la anterior, dado que el 25% de sus conidios germinan en las primeras 24 h y un 78% a las 48 h. Esta cepa carece de la actividad de catalasa-3

pero sí tiene actividad de chaperona. El resultado muestra que la actividad de catalasa-3 es importante para la germinación y también la actividad de chaperona aunque menos que la actividad de catalasa. La doble mutante es similar a la WT.



**Figura 27. Porcentaje de germinación de las diferentes cepas.** Porcentaje de conidios germinados de las diferentes cepas a las 24, 48 y 72 h de incubación a 30 °C en medio de colonia aislada. Cada barra es el promedio del resultado de tres experimentos independientes.

#### 4.2.2.2. Crecimiento de las cepas en condiciones de estrés por calor

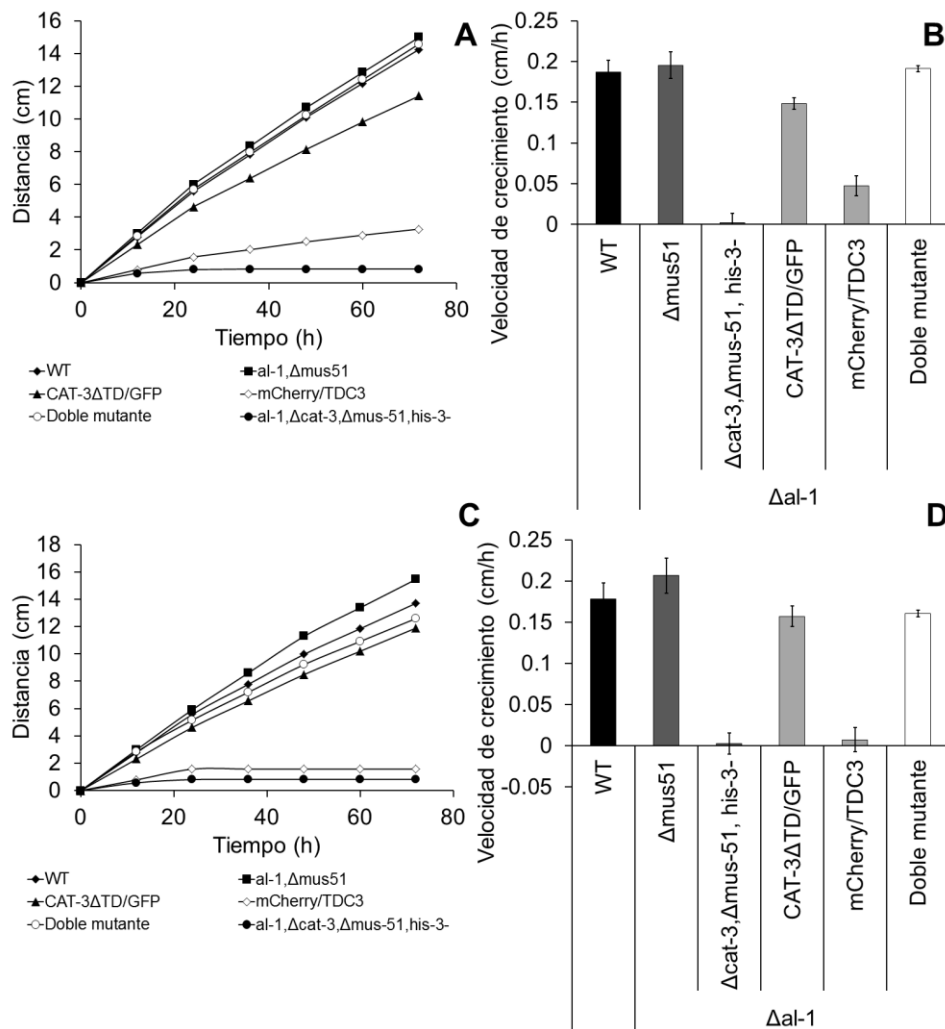
Se observó el crecimiento de las diferentes cepas en condiciones de estrés por calor incubando a 42 °C en medio VS-agar en presencia de luz, condición en la que se induce la mCherry/TDC3 (Figura 28 A, B). A esta temperatura todas las cepas crecen menos que a 30 °C (Figura 24). Las cepas WT,  $\Delta al-1; \Delta mus-51$  y la  $\Delta al-1$ ; doble mutante crecen de manera similar y la reducción en la velocidad de crecimiento es del 60% en comparación con el de 30 °C. En estas condiciones las tres cepas tienen actividad de catalasa y de chaperona. La cepa  $\Delta al-1; CAT-3^{\Delta TD/GFP}$  crece un 65% menos a 42 que a 30 °C. Esta cepa tiene actividad de catalasa-3, pero no de chaperona. En contraste, la cepa  $\Delta al-1; \Delta cat-3; \Delta mus-51; his3^-$  no puede crecer a 42 °C ya que carece tanto de la actividad de catalasa-3 como de chaperona. En cambio

la cepa *Δal-1*;mCherry/TDC3, que induce la actividad de chaperona con la luz, sí presenta crecimiento, aunque con una reducción del 83% con respecto al de 30 °C.

Al crecer las cepas a 42 °C en ausencia de luz (Figura 28 C, D), condición en la que se deja de inducir mCherry/TDC3, se comportan de manera similar la cepa WT y la *Δal-1*;Δ*mus-51*, aunque la primera crece un poco mejor. La mutante doble y la *Δal-1*;CAT-3<sup>ΔTD/GFP</sup> crecen un poco menos. Ambas tienen actividad de catalasa-3, pero no de chaperona; la mutante doble en la oscuridad no induce el TDC3 y crece 15% menos que con luz. La cepa *al-1*;Δ*cat-3*;Δ*mus-51*;his3<sup>-</sup> no crece a 42 °C y la cepa *Δal-1*;mCherry/TDC3 en la oscuridad deja de crecer después de las primeras 24 h. En estas condiciones estas dos cepas carecen de actividad de catalasa-3 y de chaperona.

Los resultados muestran que la CAT-3 es indispensable para el crecimiento del hongo a 42 °C. Ambas actividades son necesarias: en comparación con la WT, la actividad de catalasa-3 permite un crecimiento del 83%; la actividad de chaperona del 22%.



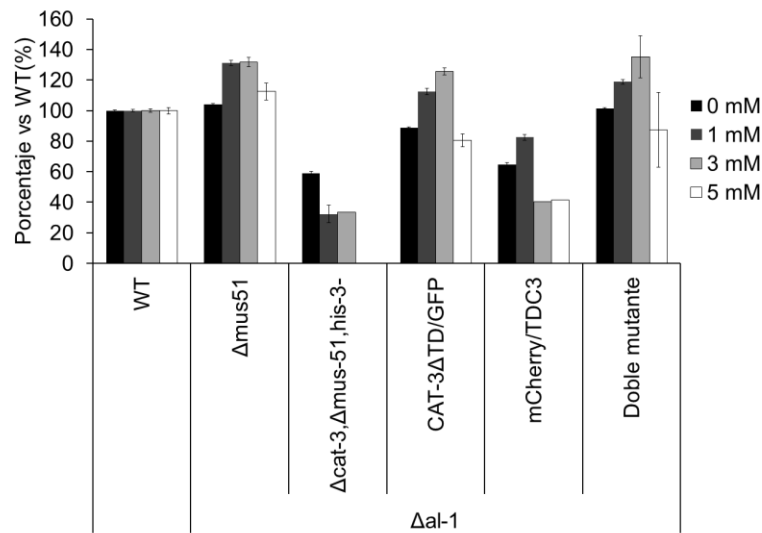


**Figura 28. Crecimiento de las diferentes cepas a 42 °C.** A) Curvas de crecimiento de las diferentes cepas en medio VS-agar a 42 °C en presencia de luz ambiental. El crecimiento (distancia desde el origen) se midió cada 12 horas durante tres días en tubos de pista: WT (rombos rellenos),  $\Delta$ al-1; $\Delta$ mus-51 (cuadrados rellenos),  $\Delta$ al-1; $\Delta$ cat-3; $\Delta$ mus-51;his3<sup>-</sup> (círculos rellenos),  $\Delta$ al-1;CAT-3 <sup>$\Delta$ TD/GFP</sup> (triángulos rellenos),  $\Delta$ al-1;mCherry/TDC3 (rombos vacíos),  $\Delta$ al-1;doble mutante (círculos vacíos). B) Velocidad del crecimiento en cm/h de las diferentes cepas a 42°C en presencia de luz. Cada barra es el promedio del resultado de tres experimentos independientes. C) Curvas de crecimiento de las diferentes cepas en medio VS-agar a 42 °C en oscuridad. La distancia del crecimiento se midió cada 12 horas por tres días en tubos de pista: WT (rombos rellenos),  $\Delta$ al-1; $\Delta$ mus-51 (cuadrados rellenos),  $\Delta$ al-1; $\Delta$ cat-3; $\Delta$ mus-51;his3<sup>-</sup>

(círculos rellenos),  $\Delta al-1$ ;CAT-3<sup>ΔTD/GFP</sup> (triángulos rellenos),  $\Delta al-1$ ;mCherry/TDC3 (rombos vacíos),  $\Delta al-1$ ;doble mutante (círculos vacíos). D) Velocidad del crecimiento en cm/h de las diferentes cepas a 42 °C en oscuridad. Cada barra es el promedio del resultado de tres experimentos independientes.

#### 4.2.2.3. Crecimiento de las cepas en condiciones de estrés oxidante

Se observó el crecimiento de las diferentes cepas en condiciones de estrés oxidante, adicionando al medio VS-agar diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 1, 3 y 5 mM) e incubando a 30 °C en presencia de luz ambiental. Se observó una reducción en la velocidad de crecimiento dependiente de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en todas las cepas (Figura 29 A). Las cepas WT,  $\Delta al-1$ ;Δ*mus-51*,  $\Delta al-1$ ;CAT-3<sup>ΔTD/GFP</sup> y la  $\Delta al-1$ ;doble mutante se comportan de manera similar presentando una reducción del crecimiento del 17 al 23 % con 1 mM, del 38 al 56 % con 3 mM y de 65 al 79 % con 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con respecto al control sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las cuatro cepas tienen actividad de catalasa-3 y también de chaperona a excepción de la  $\Delta al-1$ ;CAT-3<sup>ΔTD/GF</sup>. La cepa  $\Delta al-1$ ;Δ*cat-3*;Δ*mus-51*;his3<sup>-</sup> presenta una reducción del crecimiento mayor, de 64 % con 1 mM, de 75% con 3 mM y deja de crecer a los 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta mutante carece tanto de la actividad de catalasa-3 como de chaperona. La cepa  $\Delta al-1$ ;mCherry/TDC3, que no tiene actividad de catalasa-3 pero sí de chaperona, también se ve afectado su crecimiento (73 % con 3 mM y 84% con 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pero menos que la anterior (Figura 29). En resumen, todas las cepas se ven afectadas en presencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero el crecimiento disminuye más en la cepa sin CAT-3 y se observa un efecto protector, aunque menor, de la actividad de chaperona.



**Figura 29. Crecimiento de las diferentes cepas en estrés oxidante con  $H_2O_2$ .**

Las cepas se hicieron crecer en medio VS-agar a 30 °C en presencia de luz ambiental, adicionando diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  de 0, 1, 3 y 5 mM. Porcentaje del crecimiento tomando el crecimiento de la WT como 100%. Cada barra es el promedio de tres experimentos independientes

## Discusión

---

Las chaperonas moleculares constituyen un mecanismo de gran importancia para la homeostasis de las proteínas durante el estrés y en múltiples procesos celulares, proveyendo a la célula protección contra la agregación de las proteínas. En este trabajo se describe la actividad de chaperona del dominio C-terminal de las LSC en condiciones *in vitro*, así como la caracterización del mecanismo de acción y la función *in vivo*, tanto en *E. coli* como en *N. crassa*.

Las LSC, al igual que las chaperonas, se expresan abundantemente y se inducen en diferentes condiciones de estrés. En *N. crassa*, la CAT-3 se expresa en abundancia durante el crecimiento, principalmente en el crecimiento exponencial tardío y al inicio del proceso de conidiación (Michán *et al.*, 2002, 2003), mientras que la CAT-1 se expresa en los conidios y el crecimiento exponencial temprano (Michán *et al.*, 2002). La CAT-3 de *N. crassa* se induce en diferentes condiciones de estrés, como son el estrés oxidante, por calor, osmótico y en presencia de una mala fuente de carbono o de nitrógeno (Michán *et al.*, 2002).

Las LSC, además de su actividad de catalasa, tienen función de chaperona, ya que protegen de la desnaturalización a otras enzimas y son capaces de ayudar a recuperar la conformación activa de la ADH después de haber sido desnaturalizada con calor (de manera independiente del ATP (Figuras 5-9). Las LSC tienen una función de chaperona mejor que la Hsp31, ya que protegen en mayor porcentaje a otras proteínas de la desnaturalización y a una menor concentración (Figuras 5-9).

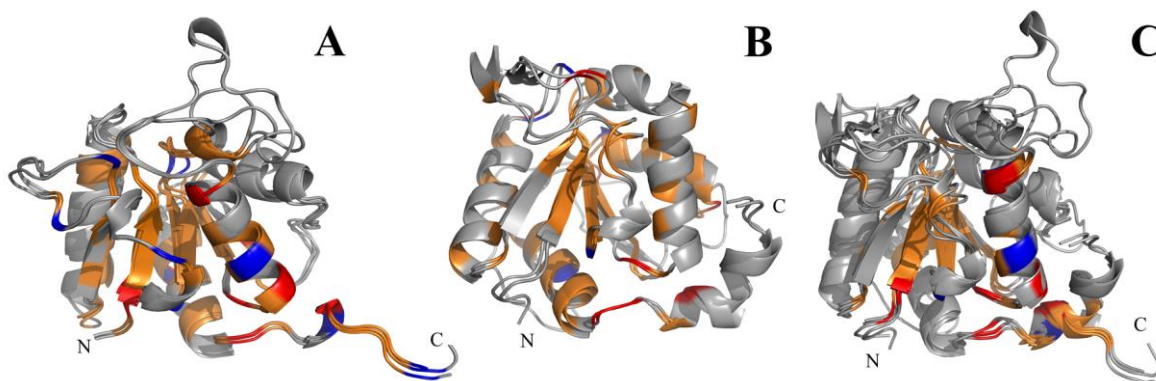
El dominio C-terminal, además de conferirle una gran estabilidad a las LSC, es el que confiere la función de chaperona y la eliminación de este dominio de las LSC resulta en la pérdida de esta función, esta función es independiente del resto de la proteína (Figuras 5-9 y Figura S3 del apéndice I). A diferencia de las otras enzimas antioxidantes con actividad de chaperona, las LSC conservan sus dos actividades en todas las condiciones, incluso durante diferentes condiciones de estrés (Figura 20-22, 28 y 29).

Estos datos, junto con los resultados experimentales de este trabajo, sustentan nuestra hipótesis de que el origen de las LSC es un gen bacteriano de SSC que se fusionó con una chaperona tipo DJ-1, que es la estructura que más se parece al dominio C-terminal, dando como resultado una catalasa con una mayor estabilidad y con actividad de chaperona, confiriendo así a la bacteria una doble ventaja, particularmente en condiciones de estrés por calor, oxidante u osmótico (Nava-Ramírez & Hansberg, 2020b). Asimismo, nuestros resultados indican que cuando *E. coli* expresa la CAT-3 o el TDC3 crece mejor en estrés por calor, oxidante u osmótico, que cuando expresa la Hsp31 (Figura 20-22). Es importante mencionar que el crecimiento después de un estrés oxidante nos permite diferenciar la contribución de la actividad de catalasa de la de chaperona de la CAT-3, al sustraer los datos del TDC3 de esta última: a concentraciones menores de 15 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la actividad de chaperona es la que protege predominantemente; a concentraciones de 20 mM o más, es la actividad de catalasa la que protege preferentemente (Figura 21), lo cual está de acuerdo con la  $K_M$  de la CAT-3 (Díaz *et al.*, 2009). Asimismo, en *Arabidopsis thaliana*, la función de sus tres SSC depende de la interacción específica de éstas con la chaperona NCA1 (No Catalase Activity 1) (Li *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2019).

El mecanismo de acción de la actividad de chaperona del dominio C-terminal de las LSC es parecido al de otras chaperonas independientes del ATP, como es el caso de Spy de *E. coli* (He *et al.*, 2020; Koldewey *et al.*, 2016). Este mecanismo depende de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, las cuales, en el caso del TDC3 y de la CAT-3, son igual de importantes, ya que ambas contribuyen en la unión con las proteínas desdobladas y la falta de una u otro tipo de interacción molecular afecta esta actividad de manera parcial (Figura 14-16). Este mecanismo también es similar al de la Hsp31 de *E. coli*, aunque en este caso tienen mayor peso las interacciones hidrofóbicas (Figura 14, 16). Falta determinar si la actividad de chaperona del TDC3 depende de su conformación dimérica o pueden presentarla también como monómero.

El dímero del dominio C-terminal de las LSC es diferente al de las otras formas diméricas de las chaperonas de la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI (Figura 6). Utilizando un análisis *in silico* se pudo predecir la zona de interacción del TDC3 con las proteínas mal dobladas, la cual corresponde al asa del extremo carboxilo de este dominio (Figura 17). Esta asa es una

diferencia que caracteriza a las LSC que se parecen a la CAT-3 y las que se parecen a la CAT-1 (Díaz *et al.*, 2009). En ambos tipos de LSC este extremo está expuesto al solvente y presenta una región que conserva la similitud de aminoácidos hidrofóbicos y con carga a nivel de estructura (Figura 30). En experimentos de acoplamiento molecular ("docking"), el asa del TDC3 participa en el 96% de las interacciones (Apéndice I.5).



**Figura 30. Alineamiento estructural y aminoácidos conservados en el dominio C-terminal de las LSC.** A) Alineamiento entre el dominio C-terminal de la CAT-3 de *N. crassa*, de la PVC de *Penicillium vitale* y la catalasa de *Mycothermus thermophilus*. Se marcaron los aminoácidos más conservados entre las catalasas tipo CAT-3. B) Alineamiento entre el dominio C-terminal de la CAT-1 de *N. crassa* y la HP11 de *E. coli*. Se marcaron los aminoácidos más conservados entre las catalasas tipo CAT-1 C) Alineamiento estructural del dominio C-terminal de las 5 catalasas de subunidad grande. Se marcaron los aminoácidos más conservados entre los dos tipos de catalasas. A, B, C) En las estructuras se marcaron los aminoácidos conservados con un porcentaje de similitud  $\geq 90\%$ , en anaranjado los aminoácidos hidrofóbicos, en rojo los aminoácidos con carga positiva y en azul los de carga negativa. Códigos del PDB: CAT-3 3ej6, CAT-1 1sy7, PVC 2xf2, MthCAT 5zz1, HP11 6by0.

Los últimos 17 aminoácidos del asa que incluyen una región conservada son: 7 aa hidrofóbicos y 9 aa con carga (3 positivos y 6 negativos), más una glicina. Al eliminar estos 17 aminoácidos del asa se pierde el 85% de la actividad de chaperona del TDC3 y la CAT-3 fortaleciendo la idea de que esta zona se requiere para la interacción con las proteínas mal plegadas (Figura 19).

Para evaluar el papel de cada función en la fisiología del hongo *N. crassa* empleamos la CAT-3 debido a que la expresión de esta enzima está asociada principalmente con las células en crecimiento (Michán *et al.*, 2002). Nuestros datos indican que la CAT-3 es necesaria para el crecimiento del hongo ya que se requiere la presencia de ambos dominios para restituir el fenotipo WT. Por sí solos, la actividad de catalasa tiene un mayor efecto en el hongo que la actividad de chaperona (Figura 24). Al crecer el hongo en condiciones de estrés por calor (42 °C), el efecto sobre el crecimiento se ve exacerbado: la CAT-3 es indispensable para el crecimiento en estas condiciones y ambas actividades son necesarias. Las cepas que carecen de ambas actividades no pueden crecer en estas condiciones, pero sí crecen, aunque poco si se expresa sólo el TDC3, esto es, la actividad de chaperona (Figura 28). Esto se explica debido a que la pérdida de la CAT-3 no es compensada con el aumento en la expresión de otras catalasas en el hongo (Michán *et al.*, 2003).

Durante la diferenciación celular, la mutante sin *cat-3* presenta una mayor producción de hifas aéreas y de conidios (Aguirre *et al.*, 2005; Michán *et al.*, 2003). Aquí mostramos que la presencia del dominio catalítico de la CAT-3 es suficiente para revertir el fenotipo de la mutante nula en la generación de conidios y en el tiempo de germinación de los conidios. La presencia del dominio de chaperona también causa una reducción, aunque menor, de la cantidad de conidios y del tiempo de germinación de los conidios en comparación de la mutante sin catalasa, no obstante que los conidios están repletos de CAT-1 (Michán *et al.*, 2002), razón por la cual al final todas las cepas logran germinar en la misma proporción que la WT. La presencia de ambos dominios en la doble mutante recupera el fenotipo de la cepa WT (Figura 25-27).

La actividad de catalasa-3 es aún más importante cuando se someten las diferentes cepas a condiciones de estrés oxidante añadiendo al medio diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En estas condiciones, la presencia del dominio catalítico tiene una reducción del crecimiento en comparación a la cepa WT, mientras que la doble mutante se comporta de manera similar a la WT. El dominio C-terminal también muestra una contribución a la supervivencia aunque en menor grado, ya que se ve menos afectada que la mutante sin CAT-3 (Figura 29). En resumen, los experimentos con las cepas mutantes de CAT-3 en *N. crassa* muestran que la actividad de catalasa-3 es importante y, en algunos casos, como el

crecimiento a 42 °C, es esencial y que también la actividad de chaperona tiene un efecto, aunque menor a la de la catalasa-3. En todos los casos la mutante doble recupera el fenotipo silvestre.

La CAT-3 se secreta al espacio extracelular (Michán *et al.*, 2003), se ha visto asociada a la pared celular (Patel & Free, 2019) y sus ortólogos se han localizado en vesículas extracelulares en diferentes hongos (Liebana-Jordan *et al.*, 2021). En *Magnaporthe grisea* se ha observado que la CAT-B, ortólogo de la CAT-3 de *N. crassa*, se encuentra unida a la pared celular, donde juega un papel importante en la integridad de la pared celular del hongo; la deficiencia de esta proteína genera una disminución de la masa micelial y reduce la patogenicidad del hongo (Skamnioti *et al.*, 2007). Considerando esto, es posible que la actividad de chaperona del dominio C-terminal tenga una función en el espacio extracelular, por lo que sería importante evaluar si hay afectación en la pared celular en la mutante  $\Delta cat-3$  y comparar con las mutantes generadas en este trabajo.

De este trabajo se ha publicado un artículo que incluye la caracterización de la actividad de chaperona *in vitro* y la supervivencia de *E. coli* (Apéndice II). Se planean escribir dos artículos más, uno en el cual se describe el mecanismo de acción de chaperona del dominio C-terminal y otro que describe el efecto *in vivo* de las dos actividades de la CAT-3, la de catalasa y la de chaperona, en *N. crassa*.



## Conclusiones

---

Las catalasas de subunidad grande tienen actividad de chaperona *in vitro* de manera similar a la Hsp31. Previenen la desnaturalización de otras proteínas y les ayudan a recuperar su estructura activa de manera independiente del ATP. Esta función de chaperona es debido al dominio C-terminal y es independiente de la actividad de catalasa, ya que el dominio por sí solo conserva esta función. Las SSC y las LSC que se les ha quitado el dominio C-terminal no tienen actividad de chaperona.

El mecanismo de acción de esta función de chaperona del dominio C-terminal de las LSC depende de interacciones de tipo hidrofóbicas y electrostáticas. La zona de interacción con las proteínas parcialmente desnaturalizadas involucra el extremo carboxilo de este dominio, ya que al eliminar el asa del extremo carboxilo se pierde esta función.

La CAT-3 y su dominio C-terminal presentan la función de chaperona *in vivo* al ser expresadas en *E. coli* y en *N. crassa*. Al expresar estas proteínas en *E. coli* aumenta la supervivencia de la cepa en condiciones de estrés por calor y oxidante. En *N. crassa*, son importantes las dos actividades de la CAT-3, de catalasa y de chaperona. Durante el crecimiento del hongo se requieren ambos dominios para obtener una velocidad de crecimiento similar a la WT. Ambos dominios son necesarios para la germinación. Además, durante la formación de los conidios en el ciclo asexual de *N. crassa* se requieren ambos dominios para restituir el fenotipo WT.

La función de chaperona también es importante en *N. crassa* en condiciones de estrés. Al exponer al hongo a estrés por calor es más importante la presencia del dominio catalítico de la CAT-3 que el dominio C-terminal por sí sólo; sin embargo, es necesaria la presencia de ambos dominios para recuperar la velocidad de crecimiento de la cepa WT. En estrés oxidante, la presencia del dominio catalítico contribuye a una mayor supervivencia del hongo, la presencia del dominio C-terminal por sí solo también tiene un efecto positivo, aunque menor al de la actividad de catalasa.

## Perspectivas

---

1. Determinar si el dominio C-terminal tiene actividad de chaperona como dímero o como monómero
2. Medir la producción del micelio aéreo de las diferentes mutantes mediante la cuantificación de la proteína total
3. Realizar las observaciones de la fluorescencia de las proteínas CAT-3<sup>ΔTD/GFP</sup> y mCherry/TDC3 en las diferentes mutantes generadas del hongo *N. crassa*, para determinar su localización celular en condiciones sin y con estrés
4. Corroborar la localización celular de las proteínas con etiquetas fluorescentes mediante microscopia confocal
5. Determinar la integridad de la pared celular de las diferentes mutantes

## Referencias

---

- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., & Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. In *Trends in Microbiology*, 13(3), 111–118.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.01.007>
- Alvarez-Castelao, B., Muñoz, C., Sánchez, I., Goethals, M., Vandekerckhove, J., & Castaño, J. G. (2012). Reduced protein stability of human DJ-1/PARK7 L166P, linked to autosomal recessive Parkinson disease, is due to direct endoproteolytic cleavage by the proteasome. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(2), 524–533.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.11.010>
- Bandyopadhyay, S., & Cookson, M. R. (2004). Evolutionary and functional relationships within the DJ1 superfamily. *BMC Evolutionary Biology*, 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-4-6>
- Barranco-Medina, S., Lázaro, J. J., & Dietz, K. J. (2009). The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function. In *FEBS Letters*, 583(12), 1809–1816.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.05.029>
- Berlin, V., & Yanofsky, C. (1985). Isolation and characterization of genes differentially expressed during conidiation of *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology*, 5(4), 849.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.5.4.849>
- Buchner, J., Grallert, H., & Jakob, U. (1998). Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein. *Methods in Enzymology*, 290, 323–338.  
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(98\)90029-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(98)90029-5)
- 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. <https://doi.org/10.1021/bi034208j>
- Chernova, L. S., Fedorova, M. S., Vishnyakov, I. E., & Kayumov, A. R. (2020). Overexpression of the recombinant IbpA protein from *Acholeplasma laidlawii* in *Escherichia coli* cells increases thermotolerance. *Journal of Physics: Conference Series*, 1695(1).  
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/1695/1/012049>
- Davis, R. H., & de Serres, F. J. (1970). Genetic and Microbiological Research Techniques for *Neurospora crassa*. *Methods in Enzymology*, 17, 79–143. <https://doi.org/10.1016/0076->

- Díaz, A., Muñoz-Clares, R. A., Rangel, P., Valdás, V. J., & Hansberg, W. (2005). Functional and structural analysis of catalase oxidized by singlet oxygen. *Biochimie*, 87(2), 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.10.014>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00637-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00637-2)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.12.019>
- Dolgacheva, L. P., Berezhnov, A. V., Fedotova, E. I., Zinchenko, V. P., & Abramov, A. Y. (2019). Role of DJ-1 in the mechanism of pathogenesis of Parkinson's disease. In *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 51(3), 175–188. <https://doi.org/10.1007/s10863-019-09798-4>
- Du, H., Kim, S., Hur, Y. S., Lee, M. S., Lee, S. H., & Cheon, C. I. (2015). A cytosolic thioredoxin acts as a molecular chaperone for peroxisome matrix proteins as well as antioxidant in peroxisome. *Molecules and Cells*, 38(2), 187–194. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.2255>
- Ellis, R. J., & Minton, A. P. (2006). Protein aggregation in crowded environments. In *Biological Chemistry*, 387(5), 485–497. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.064>
- Goemans, C. V., Beaufay, F., Arts, I. S., Agrebi, R., Vertommen, D., & Collet, J. F. (2018). The chaperone and redox properties of cnox chaperedoxins are tailored to the proteostatic needs of bacterial species. *MBio*, 9(6), 1–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01541-18>
- Hall, D. (2020). On the nature of the optimal form of the holdase-type chaperone stress response. *FEBS Letters*, 594(1), 43–66. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13580>
- Hansberg, W., & Aguirre, J. (1990). Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *Journal of Theoretical Biology*, 142(2), 201–221. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(05\)80222-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(05)80222-X)
- Hansberg, W., Aguirre, J., Rís-Momberg, M., Rangel, P., Peraza, L., Montes de Oca, Y., & Cano-

- Domínguez, N. (2008). Chapter 15 Cell differentiation as a response to oxidative stress. *British Mycological Society Symposia Series*, 27(C), 235–257. [https://doi.org/10.1016/S0275-0287\(08\)80057-4](https://doi.org/10.1016/S0275-0287(08)80057-4)
- Hansberg, Wilhelm. (1996). A hyperoxidant state at the start of each developmental stage during *Neurospora crassa* conidiation. *Ciência e Cultura.*, 48(1-2), 68–74.
- Hansberg, Wilhelm, Salas-Lizana, R., & Domínguez, L. (2012). Fungal catalases: function, phylogenetic origin and structure. In *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.05.014>
- Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. In *Nature*, 475(7356), 324–332. <https://doi.org/10.1038/nature10317>
- Hartl, F. U., & Hayer-Hartl, M. (2009). Converging concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Nature Structural & Molecular Biology* 2009 16:6, 16(6), 574–581. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1591>
- Hawe, A., Sutter, M., & Jiskoot, W. (2008). Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. In *Pharmaceutical Research*, 25(7), 1487–1499. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9516-9>
- He, W., Zhang, J., Sachsenhauser, V., Wang, L., Bardwell, J. C. A., & Quan, S. (2020). Increased surface charge in the protein chaperone Spy enhances its anti-aggregation activity. *Journal of Biological Chemistry*, 295(42), 14488–14500. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.012300>
- Hiller, S., & Burmann, B. M. (2018). Chaperone–client complexes: A dynamic liaison. *Journal of Magnetic Resonance*, 289, 142–155. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2017.12.008>
- Horvath, M. M., & Grishin, N. V. (2001). The C-terminal domain of HP1 catalase is a member of the type I glutamine amidotransferase superfamily. *Proteins*, 42(2), 230–236. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20010201\)42:2%3C230::AID-PROT100%3E3.0.CO;2-J](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0134(20010201)42:2%3C230::AID-PROT100%3E3.0.CO;2-J)
- Horwitz, J. (1992).  $\alpha$ -Crystallin can function as a molecular chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(21), 10449–10453. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.21.10449>
- Hossain, M. T., & Aso, Y. (2016). Buffers ionic strength on the chaperone-like activity (CLA) of

- silkworm small heat shock protein: sHSP19.9 and sHSP20.8. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 12(2), 241–249. <https://doi.org/10.3329/jbau.v12i2.28678>
- Jang, H. H., Lee, K. O., Chi, Y. H., Jung, B. G., Park, S. K., Park, J. H., Lee, J. R., Lee, S. S., Moon, J. C., Yun, J. W., Choi, Y. O., Kim, W. Y., Kang, J. S., Cheong, G. W., Yun, D. J., Rhee, S. G., Cho, M. J., & Lee, S. Y. (2004). Two enzymes in one: two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell*, 117(5), 625–635. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.002>
- Jaspard, E., & Hunault, G. (2016). sHSPdb: A database for the analysis of small Heat Shock Proteins. *BMC Plant Biology*, 16(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0820-6>
- Jiao, W., Hong, W., Li, P., Sun, S., Ma, J., Qian, M., Hu, M., & Chang, Z. (2008). The dramatically increased chaperone activity of small heat-shock protein IbpB is retained for an extended period of time after the stress condition is removed. *Biochemical Journal*, 410(1), 63–70. <https://doi.org/10.1042/BJ20071120>
- Jung, H. J., Kim, S., Kim, Y. J., Kim, M. K., Kang, S. G., Lee, J. H., Kim, W., & Cha, S. S. (2012). Dissection of the dimerization modes in the DJ-1 superfamily. *Molecules and Cells*, 33(2), 163–171. <https://doi.org/10.1007/s10059-012-2220-6>
- Kern, R., Malki, A., Holmgren, A., & Richarme, G. (2003). Chaperone properties of *Escherichia coli* thioredoxin and thioredoxin reductase. *Biochemical Journal*, 371(3), 965–972. <https://doi.org/10.1042/BJ20030093>
- Kim, J., Choi, D., Cha, S. Y., Oh, Y. M., Hwang, E., Park, C., & Ryu, K. S. (2018). Zinc-mediated reversible multimerization of Hsp31 enhances the activity of holding chaperone. *Journal of Molecular Biology*, 430(12), 1760–1772. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.04.029>
- Koldewey, P., Horowitz, S., & Bardwell, J. C. A. (2017). Chaperone-client interactions: non-specificity engenders multifunctionality. In *Journal of Biological Chemistry*, 292(29), 12010–12017. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.796862>
- Koldewey, P., Stull, F., Horowitz, S., Martin, R., & Bardwell, J. C. A. (2016). Forces driving chaperone action. *Cell*, 166(2), 369–379. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.054>
- Lee, C., Kim, H., & Bardwell, J. C. A. (2018). Electrostatic interactions are important for chaperone–client interaction in vivo. *Microbiology (United Kingdom)*, 164(7), 992–997.

- Lee, J. R., Lee, S. S., Jang, H. H., Lee, Y. M., Park, J. H., Park, S. C., Moon, J. C., Park, S. K., Kim, S. Y., Lee, S. Y., Chae, H. B., Jung, Y. J., Kim, W. Y., Shin, M. R., Cheong, G. W., Kim, M. G., Kang, K. R., Lee, K. O., Yun, D. J., & Lee, S. Y. (2009). Heat-shock dependent oligomeric status alters the function of a plant-specific thioredoxin-like protein, AtTDX. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(14), 5978–5983. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811231106>
- Lee, S. J., Kim, S. J., Kim, I. K., Ko, J., Jeong, C. S., Kim, G. H., Park, C., Kang, S. O., Suh, P. G., Lee, H. S., & Cha, S. S. (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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304517200>
- Li, J., Liu, J., Wang, G., Cha, J. Y., Li, G., Chen, S., Li, Z., Guo, J., Zhang, C., Yang, Y., Kim, W. Y., Yun, D. J., Schumaker, K. S., Chen, Z., & Guo, Y. (2015). A chaperone function of NO CATALASE ACTIVITY1 Is required to maintain catalase activity and for multiple stress responses in arabidopsis. *Plant Cell*, 27(3), 908–925. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.135095>
- Li, Z., Natarajan, P., Ye, Y., Hrabec, T., & Godzik, A. (2014). POSA: A user-driven, interactive multiple protein structure alignment server. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W240–W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gku394>
- Liebana-Jordan, M., Brotons, B., Falcon-Perez, J. M., & Gonzalez, E. (2021). Extracellular vesicles in the fungi kingdom. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13). <https://doi.org/10.3390/IJMS22137221>
- Liu, J., Cui, L., Xie, Z., Zhang, Z., Liu, E., & Peng, X. (2019). Two NCA1 isoforms interact with catalase in a mutually exclusive manner to redundantly regulate its activity in rice. *BMC Plant Biology*, 19(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1707-0>
- Loewen, P. C., & Triggs, B. L. (1984). Genetic mapping of katF, a locus that with katE affects the synthesis of a second catalase species in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 160(2).
- Loewen, P. C., Triggs, B. L., George, C. S., & Hrabarchuk, B. E. (1985). Genetic mapping of katG, a locus that affects synthesis of the bifunctional catalase-peroxidase hydroperoxidase I in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 162(2).

- Lucas, I. J., & Marín, I. (2007). A new evolutionary paradigm for the Parkinson disease gene DJ-1. *Molecular Biology and Evolution*, 24(2), 551–561. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl186>
- Lumb, R. A., & Bulleid, N. J. (2002). Is protein disulfide isomerase a redox-dependent molecular chaperone? *EMBO Journal*, 21(24), 6763–6770. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf685>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)03053-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)03053-X)
- Men, L., & Wang, Y. (2007). The oxidation of yeast alcohol dehydrogenase-1 by hydrogen peroxide *in vitro*. *Journal of Proteome Research*, 6(1), 216–225. <https://doi.org/10.1021/pr0603809>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00909-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00909-7)
- 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. <https://doi.org/10.1128/EC.2.4.798-808.2003>
- Montes de Oca, Y. (1999). Detección intracelular de catalasas durante el ciclo de crecimiento y conidiación de *Neurospora crassa*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Morgunov, I., & Srere, P. A. (1998). Interaction between citrate synthase and malate dehydrogenase: Substrate channeling of oxaloacetate. *Journal of Biological Chemistry*, 273(45), 29540–29544. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.45.29540>
- Mujacic, M., & Baneyx, F. (2007). Chaperone Hsp31 contributes to acid resistance in stationary-phase *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 1014–1018. <https://doi.org/10.1128/AEM.02429-06>
- Nava-Ramírez, T. (2017). Las catalasas de subunidad grande también son chaperonas. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Nava-Ramírez, T., & Hansberg, W. (2020a). Características comunes de las chaperonas pequeñas y dimericas. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23, 1–13.



<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.234>

- Nava-Ramírez, T., & Hansberg, W. (2020b). Chaperone activity of large-size subunit catalases. *Free Radical Biology and Medicine*, 156, 99–106.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.05.020>
- Negi, S. S., Schein, C. H., Oezguen, N., Power, T. D., & Braun, W. (2007). InterProSurf: a web server for predicting interacting sites on protein surfaces. *Bioinformatics*, 23(24), 3397–3399.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm474>
- Noventa-Jordão, M. A., Couto, R. M., Goldman, M. H. S., Aguirre, J., Iyer, S., Caplan, A., Terenzi, H. F., & Goldman, G. H. (1999). Catalase activity is necessary for heat-shock recovery in *Aspergillus nidulans* germlings. *Microbiology*, 145(11), 3229–3234.  
<https://doi.org/10.1099/00221287-145-11-3229>
- Oshinbolu, S., Shah, R., Finka, G., Molloy, M., Uden, M., & Bracewell, D. G. (2018). Evaluation of fluorescent dyes to measure protein aggregation within mammalian cell culture supernatants. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(3), 909–917.  
<https://doi.org/10.1002/jctb.5519>
- Patel, P. K., & Free, S. J. (2019). The genetics and biochemistry of cell wall structure and synthesis in *Neurospora crassa*, a model filamentous fungus. In *Frontiers in Microbiology*, 10.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02294>
- Quigley, P. M., Korotkov, K., Baneyx, F., & Ho, W. G. J. (2004). A new native EcHsp31 structure suggests a key role of structural flexibility for chaperone function. *Protein Science*, 13(1), 269–277. <https://doi.org/10.1110/ps.03399604>
- Ramírez Cota, R. M. (2010). Localización y dinamica de las proteínas GRB y APS-1 durante la división nuclear en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*. Tesis de maestria. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Saibil, H. (2013). Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(10), 630–642. <https://doi.org/10.1038/nrm3658>
- Sastry, M. S. R., Korotkov, K., Brodsky, Y., & Baneyx, F. (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.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M205800200>

- 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 of the United States of America*, 101(23), 8587–8592. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403033101>
- Schliebs, W., Würtz, C., Kunau, W. H., Veenhuis, M., & Rottensteiner, H. (2006). A eukaryote without catalase-containing microbodies: *Neurospora crassa* exhibits a unique cellular distribution of its four catalases. *Eukaryotic Cell*, 5(9), 1490–1502. <https://doi.org/10.1128/EC.00113-06>
- Seale, J. W., Martinez, J. L., & Horowitz, P. M. (1995). Photoincorporation of 4,4'-bis(1-anilino-8-naphthalenesulfonic acid) into the apical domain of GroEL: specific information from a nonspecific probe. *Biochemistry*, 34(22), 7443–7449. <https://doi.org/10.1021/bi00022a018>
- Sevinc, M. S., Switala, J., Bravo, J., Fita, I., & Loewen, P. C. (1998). Truncation and heme pocket mutations reduce production of functional catalase HP11 in *Escherichia coli*. *Protein Engineering*, 11(7), 549–555. <https://doi.org/10.1093/protein/11.7.549>
- Shao, F., Bader, M. W., Jakob, U., & Bardwell, J. C. A. (2000). DsbG, a protein disulfide isomerase with chaperone activity \*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13349–13352. <https://doi.org/10.1074/JBC.275.18.13349>
- Shendelman, S., Jonason, A., Martinat, C., Leete, T., & Abeliovich, A. (2004). DJ-1 Is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits  $\alpha$ -synuclein aggregate formation. *PLoS Biology*, 2(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020362>
- Skamnioti, P., Henderson, C., Zhang, Z., Robinson, Z., & Gurr, S. J. (2007). A novel role for catalase B in the maintenance of fungal cell-wall integrity during host invasion in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(5), 568–580. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-5-0568>
- Suaste-Olmos, F., Ziri6n-Mart6nez, C., Takano-Rojas, H., & Peraza-Reyes, L. (2018). Meiotic development initiation in the fungus *Podospora anserina* requires the peroxisome receptor export machinery. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1865(4), 572–586. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.01.003>

- Suss, O., & Reichmann, D. (2015). Protein plasticity underlines activation and function of ATP-independent chaperones. In *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2(JUL), 43  
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2015.00043>
- Takeuchi, S. (2006). Analytical assays of human HSP27 and thermal-stress survival of *Escherichia coli* cells that overexpress it. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341(4), 1252–1256. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.090>
- Teixeira, F., Castro, H., Cruz, T., Tse, E., Koldewey, P., Southworth, D. R., Tomás, A. M., & Jakob, U. (2015). Mitochondrial peroxiredoxin functions as crucial chaperone reservoir in *Leishmania infantum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(7), E616–E624. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419682112>
- Teo, J. W. P., Kum, S., Jureen, R., & Lin, R. T. P. (2015). *Molecular Characterization of a Catalase-Negative Staphylococcus aureus Blood Culture Isolate*, 53(11):3699-701.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.01271-15>
- Tian, W., Chen, C., Lei, X., Zhao, J., & Liang, J. (2018). CASTp 3.0: Computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W363–W367.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gky473>
- Toledo, I., Aguirre, J. 's, & Hansberg, W. (1986). Aerial growth in *Neurospora crassa*: Characterization of an experimental model system. *Experimental Mycology*, 10(2), 114–125.  
[https://doi.org/10.1016/0147-5975\(86\)90037-X](https://doi.org/10.1016/0147-5975(86)90037-X)
- Tsai, B., Rodighiero, C., Lencer, W. I., & Rapoport, T. A. (2001). Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell*, 104(6), 937–948.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00289-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00289-6)
- Wang, C. C. (2002). Protein disulfide isomerase as an enzyme and a chaperone in protein folding. *Methods in Enzymology*, 348, 66–75. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)48627-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)48627-2)
- Wang, Lei, Wang, X., & Wang, C. C. (2015). Protein disulfide-isomerase, a folding catalyst and a redox-regulated chaperone. *Free Radical Biology and Medicine*, 83, 305–313.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.007>
- Wang, Lining, Wu, X., Gao, W., Zhao, M., Zhang, J., & Huang, C. (2017). Differential expression patterns of *Pleurotus ostreatus* catalase genes during developmental stages and under heat

- stress. *Genes*, 8(11), 335. <https://doi.org/10.3390/genes8110335>
- Webster, J. M., Darling, A. L., Uversky, V. N., & Blair, L. J. (2019). Small heat shock proteins, big impact on protein aggregation in neurodegenerative disease. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01047>
- 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), 0120–0126. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030010>
- Westergaard, H. K. M. (1947). A synthetic medium favoring sexual reproduction. *Am. J. Bot.*, 34, 573–577.
- Wilson, R., Lees, J. F., & Bulleid, N. J. (1998). Protein disulfide isomerase acts as a molecular chaperone during the assembly of procollagen. *Journal of Biological Chemistry*, 273(16), 9637–9643. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.16.9637>
- Zámocký, M., Gasselhuber, B., Furtmüller, P. G., & Obinger, C. (2012). Molecular evolution of hydrogen peroxide degrading enzymes. In *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 131–144. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.01.017>
- Zeida, A., Manta, B., & Trujillo, M. (2020). *In vivo* observation of peroxiredoxins oligomerization dynamics. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(32), 18918–18920. <https://doi.org/10.1073/pnas.2012207117>
- Zhou, W., Zhu, M., Wilson, M. A., Petsko, G. A., & Fink, A. L. (2006). The oxidation state of DJ-1 regulates its chaperone activity toward  $\alpha$ -synuclein. *Journal of Molecular Biology*, 356(4), 1036–1048. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.12.030>
- Zimmerman, S. B., & Trach, S. O. (1991). Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 222(3), 599–620. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90499-V](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90499-V)

## Apéndice I

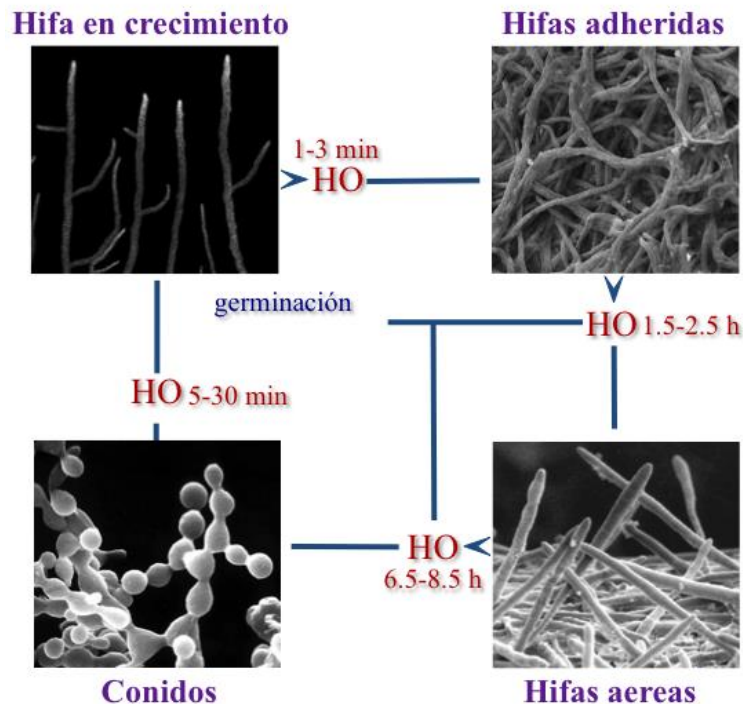
---

### 1. Ciclo de vida asexual de *N. crassa* y descripción del sistema modelo

*Neurospora crassa* es un hongo filamentoso perteneciente al filo Ascomycota, clase de los Ascomycetes, que se caracteriza por presentar un color anaranjado debido a la gran cantidad de carotenos que produce. El hongo presenta varios tipos celulares, muchos de los cuales derivan de las células somáticas llamadas hifas (estructura fundamental de los hongos filamentosos). Las hifas contienen muchos núcleos haploides, son septadas con un poro en medio del septo el cual está asociado a un organelo denominado cuerpo de Woronin. Al conjunto de hifas se le conoce como micelio. *N. crassa* tiene dos ciclos de vida, uno sexual y otro asexual, siendo este último el modelo de estudio de nuestro laboratorio este último.

El ciclo de vida asexual se caracteriza por la germinación y crecimiento de las esporas asexuales o conidios, resultando en hifas en crecimiento que en un medio sólido se pueden unir entre sí mediante hifas más delgadas constituyendo una colonia. Cuando el micelio en un medio líquido detecta la falta de nutrimentos o es expuesto al aire, las hifas detienen su crecimiento y se adhieren entre sí dando paso al micelio adherido. A partir del micelio adherido se forma el micelio aéreo, compuesto por hifas que tienen una pared hidrofóbica, las cuales crecen y se ramifican y posteriormente generaran conidios en sus puntas. Los conidios se dispersaran y germinan en otros sitios que tengan nutrientes disponibles (Figura S1) (Berlin & Yanofsky, 1985; Toledo et al., 1986).

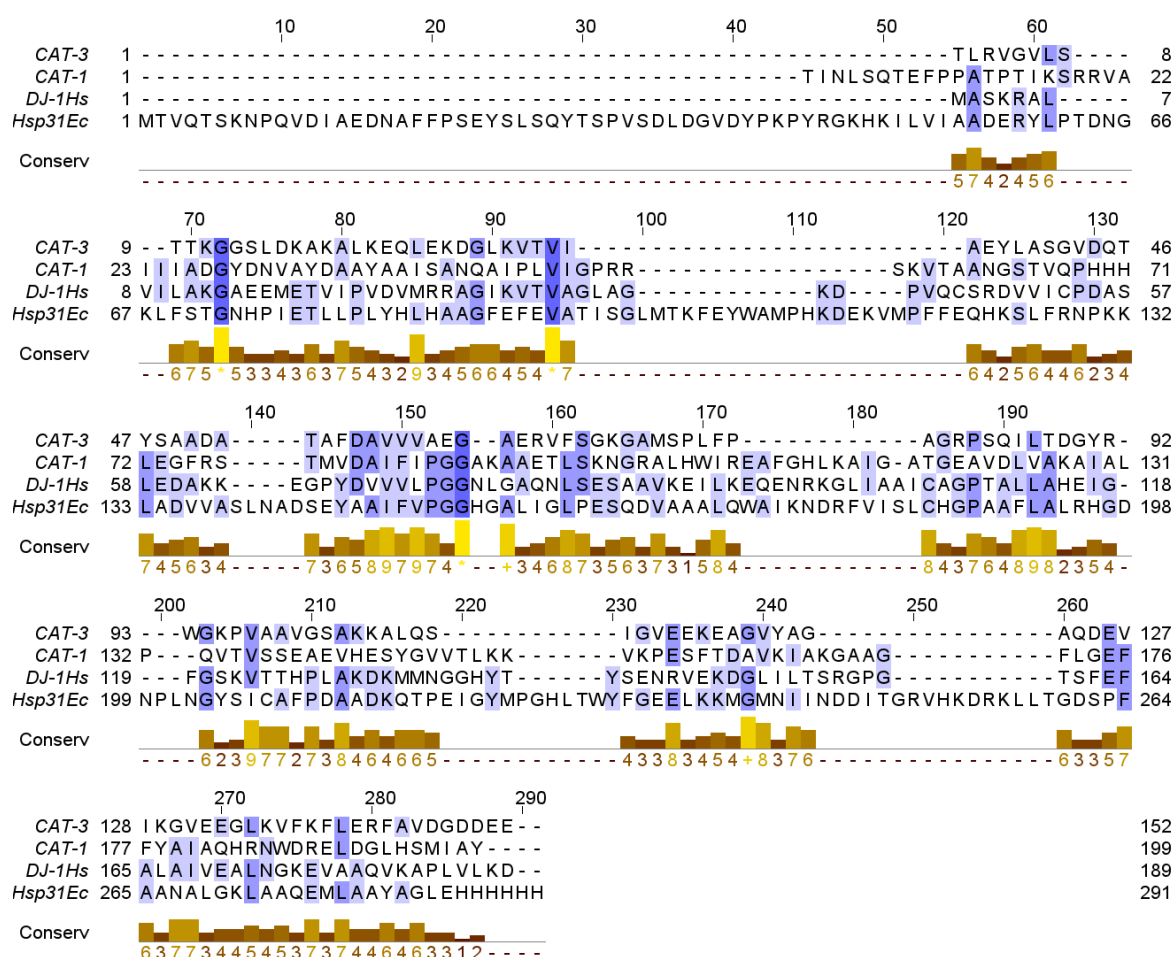
En el laboratorio del Dr. Wilhelm Hansberg y Torres se observó que previo a cada estadio morfogénico del hongo en el ciclo de vida asexual hay un incremento en las ERO intracelulares. La hipótesis de nuestro laboratorio es que la diferenciación celular es una respuesta a un estado hiperoxidante (OH por sus siglas en inglés) (Figura S1) (Aguirre *et al.*, 2005).



**Figura S1. Ciclo de vida asexual del hongo *N. crassa*.** Esquema del ciclo de vida asexual de *N. crassa* en el cual las transiciones morfogénicas de este ciclo están representadas por imágenes de microscopía electrónica. En rojo se indican los tiempos en los que se observó un aumento de las ERO intracelulares o estado OH: cuando las hifas en crecimiento se exponen al aire el OH ocurre en los primeros 3 minutos de exposición, iniciando la adhesión de las hifas; previo a la formación de las hifas aéreas entre las 1.5 a 2.5 h de exposición al aire; previo a la formación de los conidios entre 6.5 a 8.5 h de exposición y durante la germinación en los conidios, entre los 5 a 30 minutos (Aguirre *et al.*, 2005; Hansberg *et al.*, 2008; W. Hansberg & Aguirre, 1990; Hansberg, 1996).

## 2. Alineamiento estructural y de secuencia de aminoácidos entre el dominio C-terminal de las LSC y Hap31 y DJ-1

Los miembros de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfp I contienen un dominio conservado llamado ThiJ o DJ-1 que está relacionado estructuralmente con el dominio glutamino-amidotransferasa tipo I (GAT) (Bandyopadhyay & Cookson, 2004; Horvath & Grishin, 2001; Lee *et al.*, 2003). En ambas familias se ha incluido las LCS debido a su dominio C-terminal. La conservación de la secuencia entre las distintas proteínas es baja (Figura S1) (Tabla S1-3).



**Figura S1. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del dominio C-terminal de la CAT-1, la CAT-3, la Hsp31 de *E.coli* y la DJ-1 de humano**

	DJ-1	CAT-1	CAT-3	Hsp31
DJ-1	-----	12.9/25.7	14.8/26.9	16.6/27.2
CAT-1	12.9/25.7	-----	11.1/21.1	7.3/17.8
CAT-3	14.8/26.9	11.1/21.1	-----	6.4/17.1
Hsp31	16.6/27.2	7.3/17.8	6.4/17.1	-----

**Tabla S1. Valores de la identidad/similitud entre las diferentes proteínas de los aminoácidos a nivel de su estructura.**

	DJ-1	CAT-1	CAT-3	Hsp31
DJ-1	-----	19.6/33	8.4/12.4	18.5/28.1
CAT-1	19.6/33	-----	17.8/27.6	3.4/6.1
CAT-3	8.4/12.4	17.8/27.6	-----	9.8/15.5
Hsp31	18.5/28.1	3.4/6.1	9.8/15.5 -	-----

**Tabla S2. Valores de la identidad/similitud entre las diferentes proteínas a nivel de secuencia de aminoácidos**

	DJ-1	CAT-1	CAT-3	Hsp31
DJ-1	-----	2.05	2.44	3.03
CAT-1	2.05	-----	2.31	2.8
CAT-3	2.44	2.31	-----	2.87
Hsp31	3.03	2.8	2.87	-----

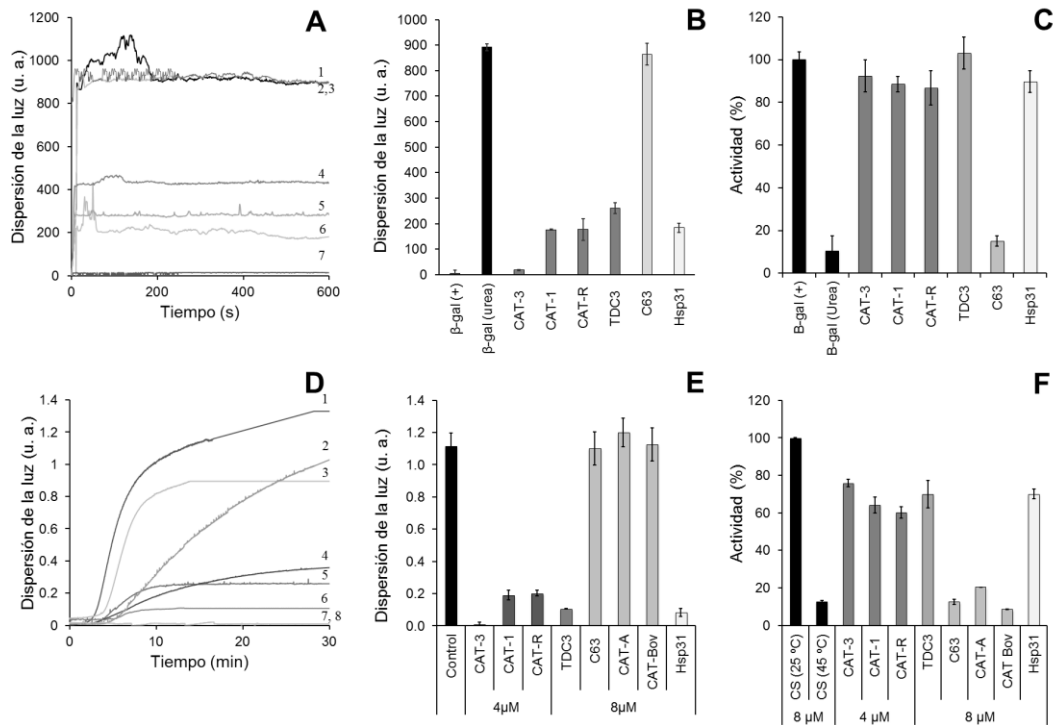
**Tabla S3. Valores de la RMSD (en Å) del alineamiento de las estructuras cristalográficas entre las diferentes proteínas**

### **3. Protección de la citrato sintasa y de la $\beta$ -galactosidasa de la desnaturalización en presencia de las catalasas de subunidad grande**

La CAT-1, la CAT-3 y la CAT-R (de *A. niger*), así como el dominio C-terminal de la CAT-3, TDC3, presenta actividad de chaperona *in vitro* protegiendo la  $\beta$ -gal de la desnaturalización en presencia de 8 M de urea y la CS de la desnaturalización con calor. La CAT-A, la CAT-Bov y la CAT-1 sin el dominio C-terminal, C63, no protegen la  $\beta$ -gal ni la CS de la desnaturalización (Figura S2 A, B y D, E).

El porcentaje de la actividad conservada presenta una relación positiva con la protección de la desnaturalización. Las LSC y el TDC3 conservan hasta en un 90% de la actividad de la  $\beta$ -gal y hasta un 70-80% de la actividad de la CS después de los ensayos, mientras que las SSC y C63 solo conservan un 10% en ambos casos (Figura S2 C y F).

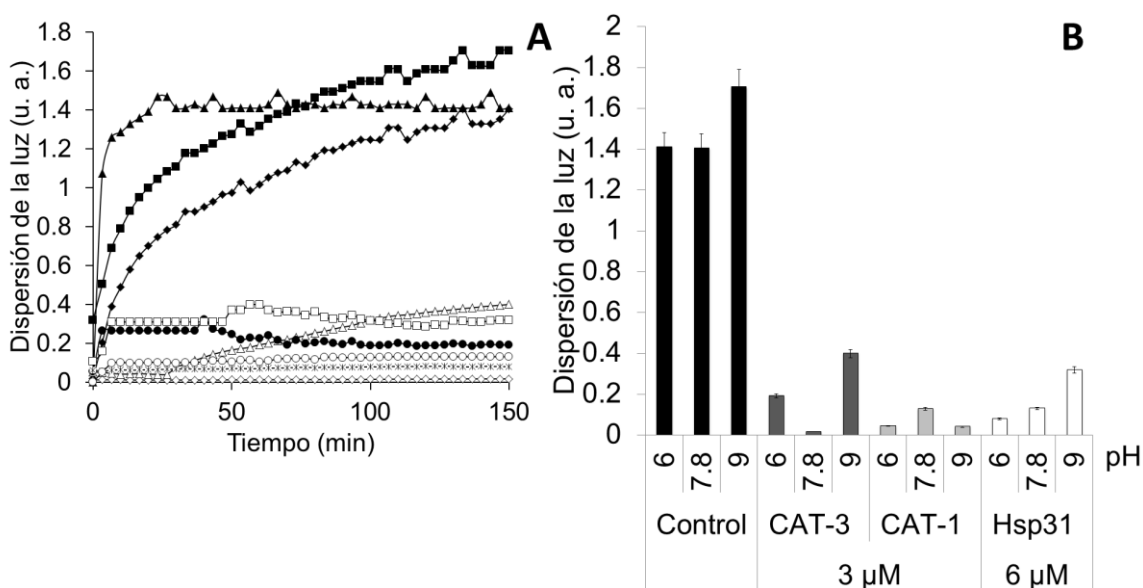




**Figura S2. Protección de la citrato sintasa y de la  $\beta$ -galactosidasa de la desnaturalización en presencia de las catalasas de subunidad grande.** A) Dispersión de la luz (u. a.) generada por la desnaturalización de la  $\beta$ -gal 0.5  $\mu$ M al ser incubada en presencia de 8 M de urea a 25 °C por 30 minutos: en presencia de BSA 0.5  $\mu$ M como control (línea 1) o en presencia de las otras proteínas al 0.5  $\mu$ M: CAT-3 (línea 7), CAT-1 (línea 6), TDC3 (línea 4), Hsp31 (línea 5), C63 (línea 3), CAT-A (línea 2). B) Promedio del valor final de dispersión de la luz de tres experimentos independientes. C) Dispersión de la luz (u. a.) generada por la desnaturalización de la CS 8  $\mu$ M por la incubación a 50 °C por 30 minutos: en presencia de BSA 8  $\mu$ M como control (línea 1), o en presencia de 4  $\mu$ M de: CAT-3 (línea 7), CAT-1 (línea 5), CAT-R (línea 4), y 8  $\mu$ M de TDC3 (línea 8), Hsp31 (línea 6), C63 (línea 2) y CAT- A (línea 3). D) Promedio del valor final de dispersión de la luz de tres experimentos independientes.

#### 4. Determinación de la participación de interacciones electrostáticas en la actividad de chaperona mediante la evaluación de la protección de la ADH de la desnaturalización a diferentes pH

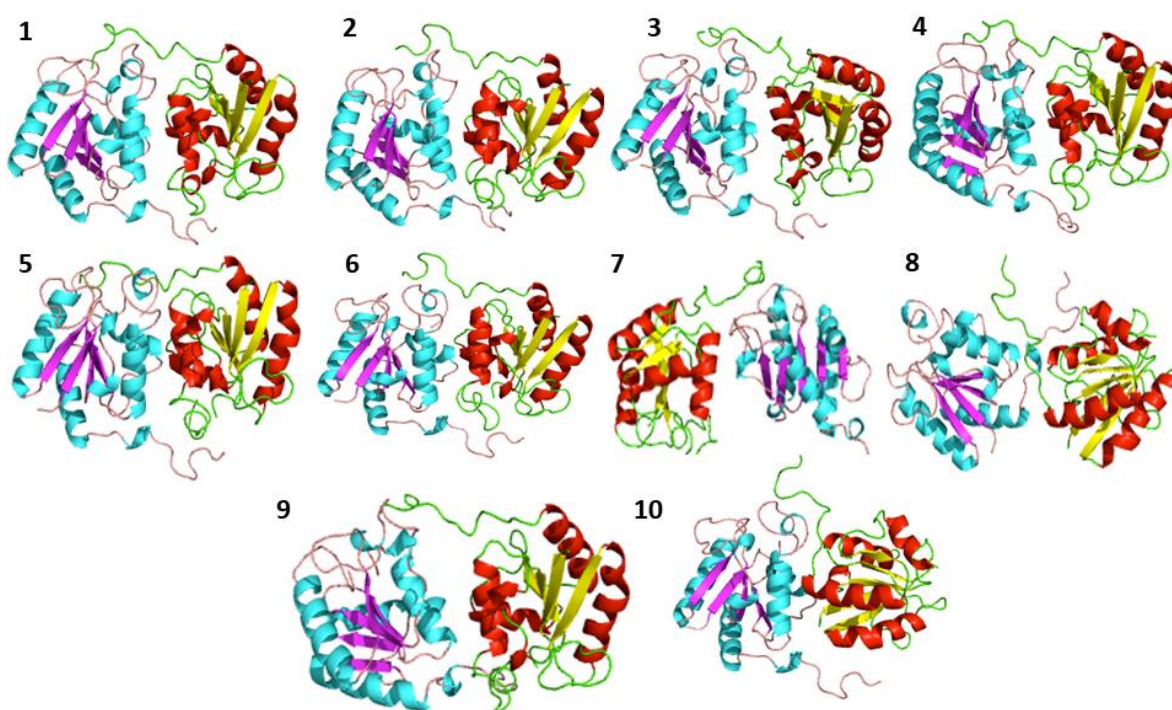
Se evaluó la protección de la ADH de la desnaturalización a 45 °C en presencia de una LSC o de Hsp31 a diferentes pH para determinar si el estado de protonación de los aminoácidos con carga tiene algún efecto sobre la actividad de chaperona. Se eligieron dos amortiguador uno a pH 6 y otro a pH 9 debido a que la actividad de la ADH es similar en ambas condiciones. Se observó que tanto la CAT-3 como la Hsp31 presentan un aumento en la señal de dispersión de la luz a pH 9, sin embargo los cambios son tan pequeños que no son concluyentes (Figura S3).



**Figura S3. Protección de la ADH de la desnaturalización a 45 °C en diferentes pH.** Se emplearon los siguientes amortiguadores: fosfato de sodio 50 mM a pH 6, fosfatos Na/K 50 mM pH 7.8, borato de sodio 50 mM pH 9. A) Dispersión de la luz (u. a.) generada por la desnaturalización de la ADH al ser incubada a 45 °C. Para el control se usó BSA a 6 μM con amortiguador a pH 6 (triángulos rellenos), pH 7.8 (rombos rellenos) y pH 9 (cuadrados rellenos). En presencia de la CAT-3 a 3 μM a pH 6 (círculos rellenos), pH 7.8 (rombos vacíos) y pH 9 (triángulos vacíos). En presencia de Hsp31 a 6 μM a pH 6 (círculos vacíos), a pH 7.8 (asteriscos) y pH 9 (cuadrados vacíos). B) Promedio del valor final de dispersión de la luz de tres experimentos independientes.

## 5. Docking del dominio C-terminal

Para determinar el tipo de interacción que tendría el dominio C-terminal en solución se realizó un docking empleando el servidor Pydock 3.0. Del resultado obtenido se observó que el 70 % de las 1000 estructuras obtenidas presentan una dimerización parecida a la presente en el tetramero, además de que en todas las posibles interacciones hay participación de los últimos 17 aa del extremo carboxilo, como lo observado en las 10 predicciones con mayor probabilidad de ocurrencia (Figura S4)



**Figura S4. Predicciones de interacción entre dos monómeros del dominio C-terminal de la CAT-3.** Se presentan las 10 predicciones con mejores puntajes y una mayor posibilidad de ocurrencia de entre los 1000 resultados devueltos por el servidor Pydock 3.0.



Contents lists available at ScienceDirect

Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/freeradbiomed](http://www.elsevier.com/locate/freeradbiomed)



Original article

## Chaperone activity of large-size subunit catalases

Teresa Nava-Ramírez, Wilhelm Hansberg\*

Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Mexico



### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Large-size subunit catalase  
C-terminal domain  
Molecular chaperone  
DJ-1  
Hsp31

### ABSTRACT

Large-size subunit catalases (LSCs) have a C-terminal domain that is structurally similar to DJ-1 and Hsp31 proteins, which have well documented molecular chaperone activity. Like chaperones, LSCs are abundant proteins that are induced under stress conditions and during cell differentiation in different microorganisms. Here we document that the C-terminal domain of LSCs assist other proteins to preserve their active conformation. Heat, urea, or  $H_2O_2$  denaturation of alcohol dehydrogenase was prevented by LSCs or the C-terminal domain of Catalase-3 (TDC3); in contrast, small-size subunit catalases (SSCs) or LSCs without the C-terminal domain ( $C3^{ATD}$  or  $C63$ ) did not have this effect. Similar results were obtained if the alcohol dehydrogenase was previously denatured by heat and then the different catalases or truncated enzymes were added. The TDC3 also protected both the  $C3^{ATD}$  and the bovine liver catalase from heat denaturation. The chaperone activity of CAT-3 or the TDC3 increased survival of *E. coli* under different stress conditions whereas the  $C3^{ATD}$  did not. It is concluded that the C-terminal domain of LSCs has a chaperone activity that is instrumental for cellular resistance to stress conditions, such as oxidative stress that leads to cell differentiation in filamentous fungi.

### 1. Introduction

Most proteins have metastable states and many cellular proteins become partially denatured or acquire a non-functional conformation under stressful conditions. Molecular chaperones are proteins that assist other proteins to gain their native functional conformation, which usually is the system's state of least energy. Chaperone are essential to all cells and are present in many if not all cellular compartments, organelles and the periplasm [1–3]. Normal cellular processes, such as translation [4] and membrane protein transport [5], require assistance of chaperones. Chaperones are abundant proteins that can proofread the three-dimensional structures of all cellular proteins [6], nevertheless, expression of many of these proteins increases under different stress conditions, not only heat shock [7], although many chaperones are called heat shock proteins (Hsp). A great variety of chaperones have been described, which can have overlapping functions and usually low specificity in their interactions with partially unfolded or misfolded proteins. Thus, there is no satisfactory classification for chaperones. Some are large and complex, such as Hsp60 (GroEL/ES), Hsp70/Hsp110 (DnaK), Hsp104 (ClpB) and Hsp90 (HtpG), and utilize ATP to attain a structural rearrangement, aided by other chaperones, like Hsp40 (DnaJ), and nucleotide exchange factors. This conformational conversion is essential for destabilizing misfolded proteins and

subsequent dissociation, enabling proteins to refold into their native conformation [6]. Low-molecular chaperones, such as the DJ-1/Hsp31 superfamily proteins, the small Hsp (sHsp) and other small-size unfolding enzymes, do not require ATP for their activity. Many of the small-size chaperones function as homodimers [8], and some can form higher order oligomers that regulate their chaperone activity [9–11].

*Neurospora crassa* asexual spore formation is a response to a recurrent oxidative stress [12–15]. *N. crassa* has two LSCs, CAT-3 and CAT-1. CAT-3 is induced during adhesion of hyphae and aerial hyphae development and CAT-1 during formation of conidia, the asexual spore [16–18]. Here we describe that LSCs also function as chaperones.

Monofunctional heme-catalases constitute a monophyletic group that is divided into two kinds and three clades: LSCs (Clade 2) and SSCs (Clade 1 and 3) [19–21]. LSCs are similar to SSCs but have an addition C-terminal domain of 100–190 amino acid residues. LSCs are mainly present in bacteria and fungi and SSCs are present in all phyla. There are also kinetic differences between the two kinds of catalases: while LSCs are activated by  $H_2O_2$  [22–24], SSCs are inhibited by  $H_2O_2$  [25].

Fungi have several monofunctional heme-catalases. Filamentous ascomycetes (Pezizomycotina) have two types of LSCs (L1 and L2), probably acquired by horizontal gene transfer from Actinobacteria [21]. Expression of L2-type are usually induced under stress conditions and have a signal peptide for protein secretion [18,21,26]; L1-type are

\* Corresponding author. Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria, Colonia UNAM, Alcaldía de Coyoacán, Ciudad de México, 04510, Mexico.  
E-mail address: [whansberg@ifc.unam.mx](mailto:whansberg@ifc.unam.mx) (W. Hansberg).

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.05.020>

Received 4 May 2020; Received in revised form 25 May 2020; Accepted 25 May 2020

Available online 02 June 2020

0891-5849/ © 2020 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

cytosolic, induced during cell differentiation and accumulate in asexual spores [16,18,21]. L2 catalases are important for growth and the start of cell differentiation [16,18]; L1 enzymes are concentrated in spores and are important for asexual spore germination [27,28]. Pezizomycotina have one to four SSCs [21]. It is generally believed that SSCs are peroxisomal enzymes, but this is usually not the case in fungi: 75% of the fungal SSCs analyzed do not have a PTS1 signal for peroxisomal localization, however Saccharomycotina generally have one peroxisomal and one cytosolic SSC and do not have LSCs [21].

Here we analyze the function of the C-terminal domain of LSCs. This domain is conserved in structure but not in its amino acid sequence. The domain belongs to the DJ-1/ThiJ/PfpI superfamily [29] and the class I glutamine amidotransferase-like superfamily [30]. The structure of the C-terminal domain of LSCs is similar to DJ-1 and Hsp31 proteins. We describe that the C-terminal domain of LSCs had a chaperone activity that can act on other proteins, reverting partially denatured or misfolded conformations, arising under various stress conditions. C-terminal domain also gives stability to the catalase enzyme. The chaperone activity of the C-terminal domain of LSCs is important for *Escherichia coli* survival under different stress conditions and probably for cell differentiation of *N. crassa* and other filamentous fungi.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reactants

The following enzymes were obtained from Sigma-Aldrich: catalase CAT-A (C3515), CAT-R (Sigma 9001-05-2, discontinued) from *Aspergillus niger* and catalase from bovine liver (CAT-Bov) (C9322), alcohol dehydrogenase (ADH) from *Saccharomyces cerevisiae* (9031-72-5), citrate synthase (CS) from porcine heart (C-3269),  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal) from *Escherichia coli* (G3153), bovine serum albumin (BSA) (A7638), subtilisin A (P5380). Other reagents used were: Isopropyl  $\beta$ -thiogalactopyranoside (IPTG) (NZYTech MB026), Sephadex G-25 (G2580), LB medium (Lennox) (L3022), bacteriologic agar (BD214010), Ampicillin sodium salt (A0166) from Sigma and hemin from Frontier Scientific (H651-9). Vogel medium was prepared according to the instructions of the Fungal Genetic Stock Center.

### 2.2. Plasmid constructs and expression in *E. coli*

The catalase-3 gene was cloned from a cDNA into plasmid pSM3 [13] and subcloned into plasmid pCold™ I [31] holding a tag of six histidine residues at the N-terminal end. Both the C3<sup>ATD</sup> (residues 1–518) and TDC3 (residues 568–719) were amplified from pSM3 and cloned into the pCold I plasmid in the *KpnI* and *XbaI* restriction sites, respectively. The Hsp31 gene was obtained from *E. coli* DNA by amplification with specific oligonucleotides and cloned into the *NdeI* and *XbaI* restriction sites of the pCold I plasmid. The *E. coli* UM2 strain, lacking both HPI (*katG*) and HPII (*katE*) catalase activities, kindly donated by P. C. Loewen [32,33] was transformed with one of the three plasmids.

From an isolated single colony, bacteria were grown overnight in LB Lennox medium containing 100 mg/mL ampicillin at 37 °C, agitating at 200 rpm. The preculture was diluted 1:10 into fresh LB medium and continued incubation up to an OD of 0.4 at 600 nm. Expression of the protein was induced with 1 mM IPTG and 30 mM hemin, pH 9.6 was added to the medium when catalases were expressed, and incubated at 16 °C, with 200 rpm agitation for 48 h.

The expressed protein, tagged with 6 histidine residues, was purified with a Ni-agarose (QIAGEN 30250) affinity column following instructions of the dealer (5th edition). Fractions containing most of the protein were concentrated with an Amicon filter (Millipore, either 30,000 Da Z740204 or 10,000 Da Z740199 cutting size) by centrifugation and verified by PAGE (either 8, 10 or 15% acrylamide) and stained with Coomassie Brilliant Blue.

CAT-1 was purified directly from *N. crassa* conidia following the method described previously [17]. To eliminate the C-terminal domain, the purified CAT-1 was treated with subtilisin 1:7 (protease/substrate) and incubate at 37 °C for 30 min to give the active C63 catalase.

### 2.3. Chaperone assays

ADH [34] or CS [35], 6  $\mu$ M, calculated as tetramers, in 50 mM phosphate buffer, pH 7, was heat denatured at 45 °C or 50 °C, respectively, for 130 min and light scattering was recorded at 360 nm in a Beckman DU650 spectrophotometer. Control (without a chaperone) contained 6  $\mu$ M BSA. CAT-1, CAT-3 or CAT-R were added at either 1.5 or 3  $\mu$ M, calculated as tetramers, C63 or C3<sup>ATD</sup> at 6  $\mu$ M, calculated as tetramers, and TDC3 or Hsp31 at 6  $\mu$ M, calculated as dimers. Because TDC3 dimerized under storage at –20 °C, TDC3 was used as soon as it was purified or stored at –20 °C in the presence of 50% glycerol to avoid oligomerization. Mixtures were done at RT in a 500 L quartz cuvette containing 400  $\mu$ L final volume. C3<sup>ATD</sup> or CAT-Bov at 6  $\mu$ M in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, were heat denatured at 55 °C for 150 or 180 min following light scattering at 360 nm in the presence of 3  $\mu$ M or 6  $\mu$ M of TDC3 or 6  $\mu$ M albumin in the control.

ADH or  $\beta$ -galactosidase was denatured in 8 M urea [36,37], in Tris 100 mM, pH 8.0, buffer for 30 min. Protein mixtures were done at RT before adding urea. Thereafter, mixtures were diluted 30 folds with Tris buffer 100 mM, pH 8.0, to a final ADH or  $\beta$ -galactosidase concentration of 0.5  $\mu$ M and immediately light scattering at 360 nm in a Beckman DU650 spectrophotometer was followed for 180 min at RT.

ADH 6  $\mu$ M in 50 mM phosphate buffer, pH 7.8, was denatured by adding 500  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (calculated with an extinction coefficient of 43.6 M<sup>–1</sup> cm<sup>–1</sup> at 240 nm) in a 1 mL quartz cuvette. For this experiment, catalase activities were inactivated by treatment of each catalase with 3 mM sodium azide at 37 °C for 30 min (23) and eliminating thereafter the azide by passing through a Sephadex G25 column.

### 2.4. Enzymatic activities

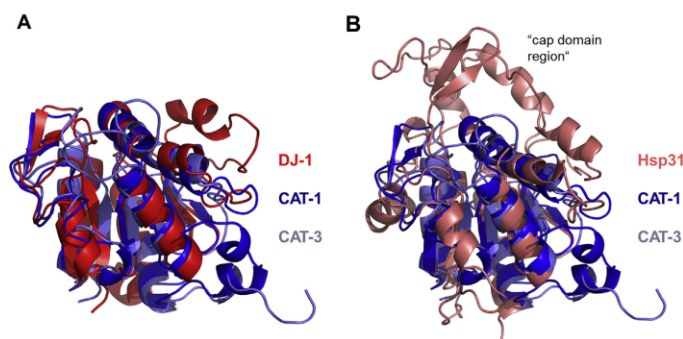
After the chaperone assay, ADH activity was measured in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, following the formation of NADH at 340 nm in a 1 mL quartz cuvette at 30 °C in a Beckman DU650 spectrophotometer, using 200 mM ethanol and 1 mM NAD [38].

Zymograms of catalase in gels after PAGE (using 1.44% glycine, 0.3% Trizma base, pH 7.0, 2 h at 150 V) were done as described previously [18]. Briefly, after PAGE, the gel was incubated in 0.03% methanol for 5 min, washed with water, and then incubated with 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5 min. After rinsing with distilled water, the gel was immersed in 10% acetic acid for 1 min and rinsed thereafter with water. The in-gel activity was revealed by incubating the gel in fresh prepared solution of ferricyanide and ferric chloride mixture, 0.3 g each in 15 mL water. The gel stains blue except in the regions where H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was consumed by the catalase activity.

### 2.5. Effect of expression of chaperones on the survival of *E. coli* subjected to different stress conditions

The *E. coli* UM2 strain was transformed with the pCold™ I plasmid containing either the Hsp31, CAT-3, TDC3 or C3<sup>ATD</sup> genes or constructs. A transformed bacterial colony was grown in LB medium, at 37 °C for 12 h with 200 rpm agitation. A 10 mL culture with a OD of 0.01 at 600 nm was grown in fresh LB medium at 37 °C up to a OD of 0.4, and then the expression of the protein was induced by adding 1 mM of IPTG and, in the case of CAT-3 and C3<sup>ATD</sup>, hemin was supplemented at a 15  $\mu$ M final concentration, incubated at 18 °C and 200 rpm agitation, up to a OD at 600 nm of 1.7. After 1 h incubation at 37 °C and 200 rpm agitation, stress conditions were imposed as follows: heat shock at 55 °C for 0, 10, 30 or 60 min; oxidative stress by addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 0, 3, 5, 7, 10, 15, 20, or 30 mM final concentration. Cultures were diluted with





**Fig. 1.** Structural alignment of the C-terminal domain of CAT-1 and CAT-3 and other members of the DJ-1/ThiJ/PfpI superfamily. A) Structural alignment of the C-terminal domain of the CAT-1 (PDB 1sy7, residues 568–736) and CAT-3 (PDB 3ej6, residues 568–716) and human DJ-1 chaperone (PDB 4rkx). B) C-terminal domain of the CAT-1 and CAT-3 and the *E. coli* Hsp31 chaperone (PDB 1n57).

fresh LB medium to an OD of 0.05 at 600 nm and transferred to a 96-wells cell culture plate and incubated in a Synergy Mx a 37 °C. Growth rate was followed for 48 h by recording OD at 600 nm every 20 min after an intense agitation for 20 s. For osmotic stress, cultures were diluted to an OD of 0.1 at 600 nm with LB medium supplemented with NaCl to a final concentration of 0, 0.15, 0.3, 0.7 or 1 M and growth was followed as described.

### 3. Results

DJ-1 and Hsp31 proteins are molecular chaperones that are structurally similar to the C-terminal domain of LSCs (Fig. 1). Multiple structural alignment was done using the server PDBeFold to compare the human DJ-1 or the *Escherichia coli* Hsp31 with the C-terminal domain of CAT-1 and CAT-3. The root-mean square deviations (RMSDs) were taken from the resulting matrices. The human DJ-1 protein structure is very similar to the C-terminal domain of CAT-1, with a RMSD of 2.05 Å. The C-terminal domain of CAT-3 gave a RMSD of 2.44 Å; the *E. coli* Hsp31 structure is also similar to the C-terminal domain of CAT-1 and CAT-3, RMSD of 2.8 Å and 2.87, respectively, but Hsp31 has a “cap domain region” [39] which is not present in catalases. In contrast, the sequence similarity between human DJ-1 and the C-terminal domain of CAT-1 and CAT-3 is 26–27% and the similarity of *E. coli* Hsp31 and the C-terminal domain of CAT-1 and CAT-3 is 17–18%, according to the structural alignment matrix. When comparing low sequence similarity polypeptides that have a similar structure, the sequence similarity obtained from the structural alignment seems to be more reliable than the data obtained from the linear alignment (Fig. 1S).

To test the possibility that a chaperone activity is associated to the C-terminal domain in LSCs, we expressed in *E. coli* the *cat-3* without the C-terminal domain (C3<sup>ΔTD</sup>) and the *cat-3* C-terminal domain alone (TDC3). These isolated peptides were tested in a chaperone assay and compared with the CAT-3, the CAT-1, purified directly from *N. crassa*, the CAT-1 treated with subtilisin to eliminate the C-terminal domain (C63) (Fig. 2S), the CAT-R, a commercially available LSC, and the SSCs: CAT-A from *A. niger* and CAT-Bov from bovine liver. The purified Hsp31 chaperone, expressed in *E. coli*, was used as a positive control and BSA as a negative control. Light scattering was utilized as a denaturing assay, testing the ADH under three different denaturing conditions: high temperature, in the presence of urea, or by adding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Other two proteins that are known to denature under various conditions, citrate synthase and β-galactosidase, were also tested (Fig. 3S).

Heat denaturation of ADH was prevented when it was incubated at 45 °C in the presence of TDC3 or a LSC, either CAT-3, CAT-1 or CAT-R, whereas almost no effect was observed when in the presence of the truncated catalases C3<sup>ΔTD</sup> or C63, nor in the presence of the SSCs, CAT-A or CAT-Bov (Fig. 2 A and B). The concentration used in this

experiment for the catalases having no C-terminal domain was twice the concentration used for the ones containing this domain. There is a concentration dependent effect for the chaperone activity of the catalases having a C-terminal domain (Fig. 2 A-B and Fig. 4S). To be certain that the ADH was denatured after the assay, the remaining ADH activity was determined (Fig. 2 C). Most of the activity (≈ 90%) was preserved in the presence of TDC3 or the LSCs, CAT-3, CAT-1 or CAT-R, whereas remaining activity was ≈ 10–20% when in the presence the truncated catalases C3<sup>ΔTD</sup> or C63 or the SSCs, CAT-A or CAT-Bov.

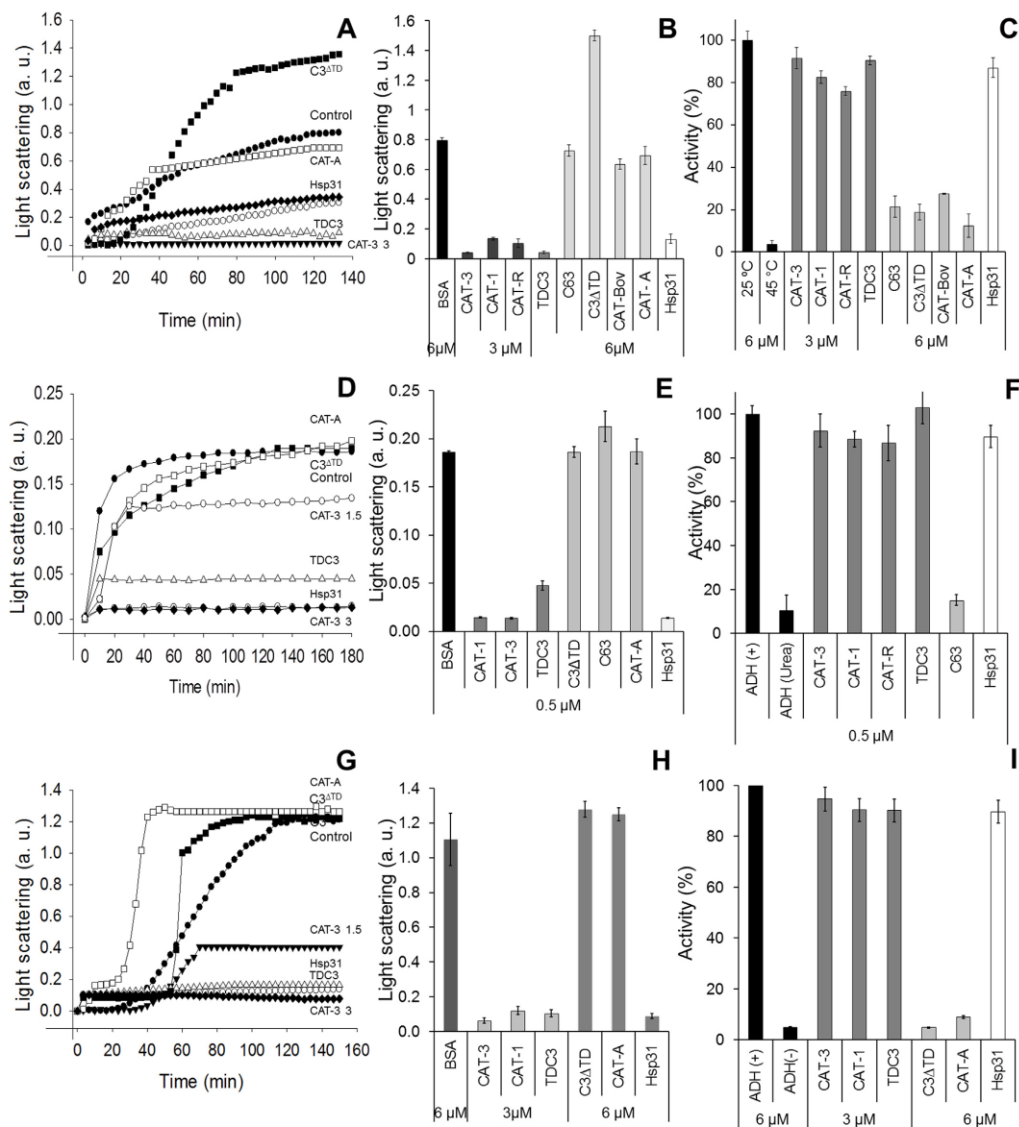
Similar results were obtained when the ADH was treated with 8 M urea: the LSCs, CAT-1, CAT-3 and CAT-R or the C-terminal domain of CAT-3 alone protected ADH from denaturation by urea, whereas the SSC CAT-A or the C-terminal-truncated catalases C63 or C3<sup>ΔTD</sup> did not (Fig. 2 D and E). The remaining ADH activity after incubation was in accordance, the C-terminal-containing catalases preserved the ADH activity while the C-terminal-truncated catalase C63 did not (Fig. 2 F).

Because catalases are induced under oxidative stress [18], a condition in which many proteins are oxidized and partially unfolded [40,41], we assayed the ADH enzyme when denatured by treatment with 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. For this experiment we inhibited the catalase activity with azide (3 mM) (23). The azide-inhibited CAT-1 or CAT-3, or the CAT-3 C-terminal domain alone, TDC3, preserved the ADH from denaturation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and also its activity, while the azide-inhibited CAT-A and the C-terminal-truncated CAT-3, C3<sup>ΔTD</sup>, did not (Fig. 2 G and H). Remaining activity was in accordance (Fig. 2 I).

Next we assayed if the C-terminal domain of LSCs not only avoided denaturation of ADH but also could recover ADH activity once denatured by heat. Both the CAT-3 and its C-terminal domain, TDC3, in the course of 3 h at RT, could recover the 100% of the ADH activity after treatment for 2.5 h at 45 °C, whereas the ADH alone recovered about 20% of its initial activity, while the SSC CAT-A had no effect and the Hsp31 could partially recover activity to about 50% (Fig. 3 A).

We noticed that the CAT-3 without its C-terminal domain, C3<sup>ΔTD</sup>, had increased light scattering (Fig. 2 A and B), indicating denaturation by heat. It has been shown that eliminating the C-terminal domain destabilizes LSCs [42]. We asked if adding the TDC3 to the C3<sup>ΔTD</sup> would protect it from heat denaturation. TDC3 protected both the C3<sup>ΔTD</sup> and the CAT-Bov from heat denaturation and protection was dependent on the amount of TDC3 added (Fig. 4).

To test if the unfolding activity of the C-terminal domain was functional *in vivo* we expressed either the CAT-3, its C-terminal domain TDC3, the catalase catalytic domain (C3<sup>ΔTD</sup>) (CAT-3 without the C-terminal domain) and the Hsp31 proteins in *E. coli* and assayed the survival of the culture when subjected to different stress conditions. Proteins were induced with IPTG using the pCold expression system in a strain without catalases (UM2). After either 10- or 30-min heat shock at 55 °C, the UM2 strain expressing no chaperone presented a decrease in viability of 50–60%, but was partially protected when expressing



(caption on next page)

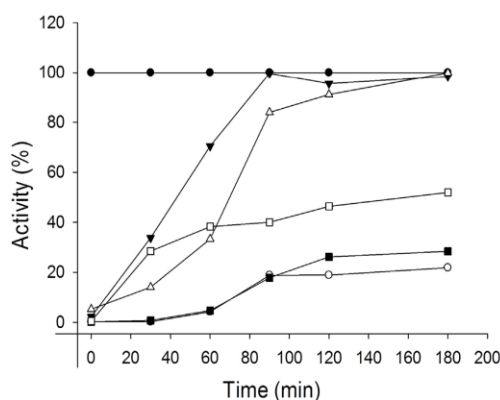
Hsp31, 20–30% loss, and fully protected when expressing CAT-3 or TDC3, even after 60 min heat shock. In contrast, expressing C3<sup>ΔTD</sup>, an active but heat labile catalase, was detrimental for survival (Fig. 5).

Survival of *E. coli* was tested after a 20 min oxidative stress using different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations (Fig. 6 A). The UM2 strain expressing no chaperone did not survive after treatment with 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and it did not survive even when expressing Hsp31 or C3<sup>ΔTD</sup>. In contrast, when expressing CAT-3, cells presented a survival of 80% at 10 mM and 65% with 15, 20 or 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. When expressing TDC3, cells survived 70%

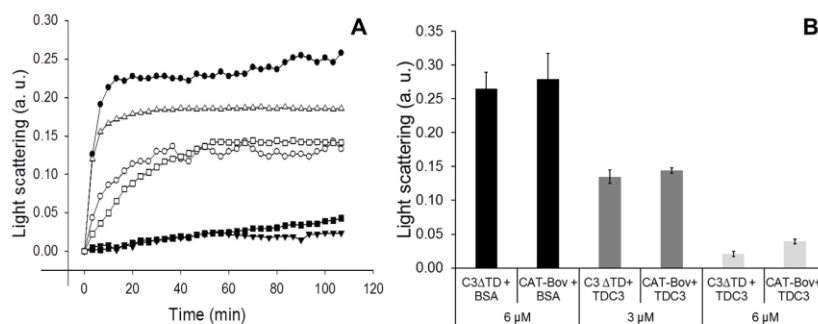
at 10, and 50% at 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; survival rate was increasingly lower at a higher concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. CAT-3 has two effects on survival of *E. coli* under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress: at lower concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (7–15 mM) the effect is mainly of the C-terminal chaperone activity, while at higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations (20–30 mM) the effect of catalase activity predominates (Fig. 6 B). At 15 and 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, both effects sum up to give a survival of 65%.

Osmotic stress was tested with NaCl, at a concentration of 0.15, 0.3 0.7 and 1 M, but only a slight difference was observed with CAT-3 and

**Fig. 2.** Protection of ADH from heat denaturation in the presence of C-terminal containing catalase polypeptides. A) Light scattering of ADH (6 mM) incubated at 45 °C for 150 min, with 6 or 3 mM of catalase protein. Negative control contained 6 mM BSA (closed circles), positive control had 6 mM of Hsp31 (closed rhomboid). ADH protection from heat denaturation by CAT-3 at 1.5 mM (open circles) and 3 mM (closed inverted triangles), TDC3 (open triangles). The C3ΔTD (closed squares) and CAT-A (open squares) had no effect. Some light scattering was observed from the C3ΔTD peptide. B) Average of three independent assays with the LSCs, CAT-3, CAT-1 or CAT-R, or the TDC3 peptide, indicating protection of ADH from heat denaturation, while low effect was observed in the presence of the SSCs, CAT-A or CAT-Bov or the C-terminal-truncated catalases, C63 or C3ΔTD. C) Remaining ADH activity (%) after incubation with a LSCs, either CAT-3, CAT-1 or CAT-R, or the TDC3 polypeptide, presenting  $\geq 80\%$  of the initial activity; the SSCs, CAT-A or CAT-Bov, or the truncated catalases C3ΔTD or C63 having  $\approx 20\%$  of the initial activity. D - F) Protection of ADH from denaturation by treatment with 8 M urea in the presence of C-terminal containing catalase polypeptides. D) Light scattering of ADH (0.5 mM) incubated with 8 M urea in the presence of BSA (0.5 mM), negative control (closed circles), or Hsp31 (0.5 mM), positive control (closed rhomboid). CAT-3 at 0.25 mM (open circles) or at 0.5 mM (closed inverted triangles) and TDC3 (0.5 mM) (open triangles) had a protection effect, whereas CAT-A (0.5 mM) (open squares) or the C-terminal-truncated C3ΔTD (0.5 mM) (closed squares) did not. E) Average of three independent assays at 180 min incubation. F) Remaining ADH activity (%) after 180 min incubation. G, H) Protection of ADH from denaturation by treatment with 500  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 150 min, with 1.5, 3 or 6 mM of the other proteins. BSA (6 mM) as negative control (closed rhomboids) and Hsp31 (6 mM) as positive control (open rhomboids). Catalase activity was inhibited with 3 mM of sodium azide. Protection of ADH from denaturation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was observed in the presence of CAT-3 at 1.5 mM (closed inverted triangles) and 3 mM, (open circles) or with TDC3 (6 mM) (open triangles) and no effect was observed with the C-terminal-truncated C3ΔTD (6 mM) (closed squares), or the CAT-A (6 mM) (open squares). H) Average of three independent experiments at 150 min incubation. I) Remaining ADH activity (%) after 150 min incubation.



**Fig. 3.** Chaperone effect on the recovery of ADH activity after heat denaturation. ADH (6  $\mu$ M) was denatured at 45 °C for 2.5 h and thereafter incubated at RT in the presence of CAT-3 (3  $\mu$ M) (closed inverted triangles), TDC3 (6  $\mu$ M) (open triangles), Hsp31 (6  $\mu$ M) (open squares), CAT-A (6  $\mu$ M) (closed squares), ADH alone (open rhomboids). Control: no treatment (closed circles).



**Fig. 4.** Protection from heat denaturation of C3ΔTD and CAT-Bov by TDC3. A) Light scattering of 6  $\mu$ M catalases incubated at 50 °C in the absence or presence of 3  $\mu$ M or 6  $\mu$ M of TDC3. With 6  $\mu$ M BSA instead of TDC3: C3ΔTD (closed circles), CAT-Bov (open triangles); with 3  $\mu$ M TDC3: C3ΔTD (open circles), CAT-Bov (open squares); with 6  $\mu$ M TDC3: C3ΔTD (closed triangles), CAT-Bov (closed squares). B) Mean of three independent experiments at 110 min incubation.

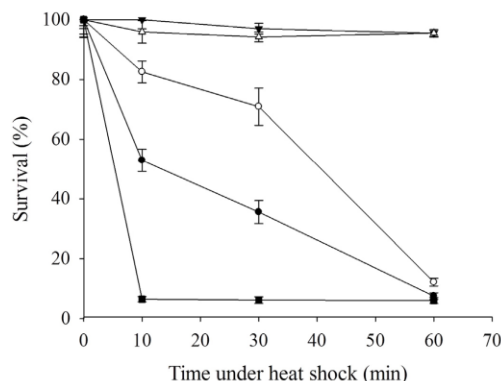
its C-terminal domain (TDC3) (Fig. 5S).

#### 4. Discussion

Common feature of molecular chaperones is the capability of these proteins to recognize non-native folds of other proteins and assist them to attain its functional conformation. Here we demonstrate that the C-terminal domain of CAT-3 and CAT-1 and another LSC (CAT-R) possessed a chaperone activity that avoided denaturation of ADH, CS or  $\beta$ -Gal under different stress conditions. Denaturation of ADH by heat, urea, or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was prevented only in the presence of the LSCs C-terminal domain, or the *E. coli* Hsp31, which was used as a positive control. In contrast, SSCs (CAT-A and CAT-Bov) and the CAT-1 or CAT-3 without the C-terminal domain (C63 and C3ΔTD) did not have such chaperone activity. It is concluded that the C-terminal domain of LSCs was capable to avoid denaturation of ADH and other proteins under various stress conditions. The C-terminal domain of LSCs probably recognizing partially unfolded or misfolded regions of the proteins under stress and the interaction of the two proteins by itself promoted the attainment of the enzyme native conformation and the recovery of enzyme activity. This notion is strengthened by the ability of CAT-3 or its C-terminal domain alone to promote refolding of the previously heat-denatured ADH and regain of its initial activity (Fig. 3). It is remarkable that in this experiment the Hsp31 was less effective than the CAT-3 C-terminal domain alone.

The C-terminal domain also conferred stability to the catalase catalytic domain C3ΔTD and to the SSC CAT-Bov and the stoichiometry of the reaction indicated a one to one interaction (Fig. 4). It also suggests that LSCs could have evolved in bacteria by a possible fusion of a DJ-1/





**Fig. 5.** Expression of different chaperones and their effect on survival of *E. coli* after incubation under heat shock. Cells under heat shock (55 °C) for 0, 10, 30 y 60 min. Labels: *E. coli* strain UM2 expressing no chaperone (closed rhomboids), UM2 strain transformed with plasmid pCold I conveying the gene for either Hsp31 (open rhomboids), CAT-3 (closed inverted triangles), TDC3 (open triangles), C3<sup>ATD</sup> (closed squares) and induced with IPTG.

ThiJ/Pfpl superfamily molecular chaperone with a SSC, giving a catalase with an increased stability. Carrying a more stable catalase would give a bacterium a selective advantage under the various stress conditions that microorganisms are frequent confronted with. This idea is reinforced by the observed increased survival of *E. coli* after heat shock when expressing the CAT-3, a very stable catalase [23] possessing chaperone activity, compared with the catalase catalytic domain C3<sup>ATD</sup>, a heat labile active catalase lacking chaperone activity, which was detrimental for survival; the C-terminal TDC3 alone also conferred full recovery from heat shock, indicating that the chaperone function of this domain is critical for heat shock recovery (Fig. 5).

Interestingly, plants have several SSCs that are stabilized by a catalase-specific chaperone which is essential for the three catalase activities of *Arabidopsis thaliana* [43,44]. Moreover, the peroxisomal catalases are protected and activated in *A. thaliana* by interacting with a sHsp which *in vitro* prevents the catalase from thermal aggregation [45]. In contrast to plants, bacteria have generally one and fungi two LSCs, which are abundant, stable proteins, having chaperone activity

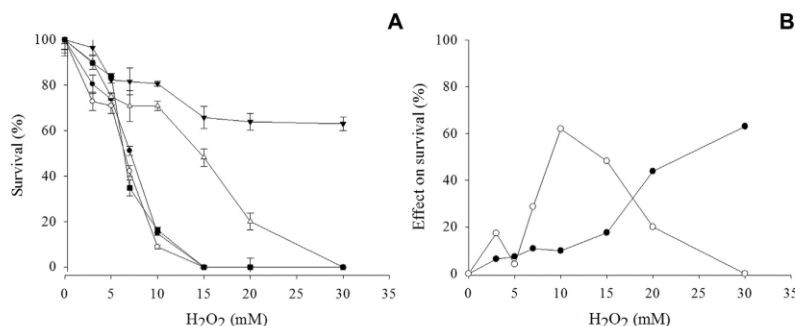
and induced under stressful conditions.

Under oxidative stress conditions imposed by adding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the culture for 20 min, expressing CAT-3 conferred an increased survival rate to *E. coli* due to its catalytic activity, by eliminating entering H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but also because of its chaperone activity, probably by avoiding aggregation of oxidized proteins. The chaperone effect was evident at lower H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations (7–15 mM); the effect of the catalase activity was predominant at higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations (20–30 mM) (Fig. 6 B), in accordance with the activation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of LSCs [24]. At 15 and 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, both effects sum up to have a survival of 65%. The chaperone activity effect was clearly observed by the survival of *E. coli* expressing the enzyme's C-terminal domain alone, that was almost as effective as the complete enzyme, under conditions of up to 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration added to the culture. At higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration (15–30 mM), TDC3 gave an increasingly lower survival rate, indicating the requirement of catalase activity. The catalytic domain alone had only a slight effect on survival of *E. coli* when the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration added was 5 mM or less. Under oxidative stress, the expressed Hsp31 did not have any effect on *E. coli* survival, as was also previously observed [46].

We used the *E. coli* Hsp31 as a positive control because the structure of the C-terminal domain of CAT-1 and CAT-3 is structurally similar, although Hsp31 protein has an extra “cap domain region” [39] that is not present in the LSCs C-terminal domain nor in DJ-1 (Fig. 1). Interestingly DJ-1/Hsp31 proteins are induced under oxidative stress in bacteria [46,47], fungi [48–50], animals [51] and plants [52].

Besides, both the *E. coli* [46,47] and *S. cerevisiae* [49,53] Hsp31 proteins are induced in the stationary growth phase. Cells in the stationary growth phase can be considered in a differentiated state because they present morphological and metabolic characteristics that are similar to spores: cells having thick walls, that accumulated different compounds and are virtually in a dormant state [54,55].

Both DJ-1 [56,57] and Hsp31 [58] proteins, besides being molecular chaperones, have a glutathione independent-glyoxalase activity (glyoxalase III), however see Ref. [59], and the *E. coli* Hsp31 also has a mild protease activity [60]. DJ-1 and Hsp31 proteins have a catalytic cysteine followed by a histidine and these two residues are essential for activity, together with a vicinal glutamic acid or aspartic acid [58]. Neither CAT-3 nor CAT-1 nor other LSCs have these conserved amino acid residues. In place of the Cys-His, CAT-3 has Gly-Ser and CAT-1 has Gly-Glu; both catalases do not have Cys residues in the C-terminal domain. Thus, the C-terminal domain of these two catalases cannot have glyoxalase or protease activity, nor can be oxidized by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The only common factor of the C-terminal domain of LSCs and Hsp31/DJ-1 is



**Fig. 6.** Expression of different chaperones and their effect on survival of *E. coli* under oxidative stress conditions. A) Cells under oxidative stress for 20 min with a concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of 0, 3, 5, 7, 10, 15, 20 and 30 mM. Labels: *E. coli* strain UM2 expressing no chaperone (closed rhomboids), UM2 strain transformed with plasmid pCold I conveying the gene for either Hsp31 (open rhomboids), CAT-3 (closed inverted triangles), TDC3 (open triangles), C3<sup>ATD</sup> (closed squares) and induced with IPTG. B) To make the two effects of CAT-3 explicit, the Hsp31 curve was subtracted from the TDC3 curve to show the CAT-3 chaperone effect on survival (open circles) and the TDC3 curve was subtracted from the CAT-3 curve to show the catalase effect (closed circles).

that they all possess a molecular chaperone activity.

Filamentous fungi have two LSCs and usually one or two Hsp31. *S. cerevisiae* has no LSCs and has four Hsp31 orthologs. It could be argued that LSCs compensates for a low number of Hsp31 orthologues in filamentous fungi. However, the number of Hsp31 genes is highly variable in both Saccharomycetes and filamentous fungi, ranging from one or two to occasionally three or more (up to seven) [61].

LSCs are not the only antioxidant enzymes that possess chaperone activity. It is well known that peroxiredoxins, besides having a function in eliminating low concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the cell and probably having a role in signal transduction [62], they acquire chaperone activity upon oligomerization. In contrast to LSC, which are antioxidant enzymes and chaperones at the same time, the chaperone activity of peroxiredoxins does not coincide with the antioxidant activity, but is related to oligomerization of the hyperoxidized, inactive enzyme [63,64].

Both CAT-3 and CAT-1 are abundant proteins in *N. crassa* and are induced under stressful conditions. Cell differentiation in *N. crassa* is a response to oxidative stress; CAT-3 is induced after the first two hyperoxidant sates and CAT-1 after the third one. CAT-1 is highly accumulated in conidia and the enzyme is important to contend with the oxidative stress that is generated during germination. Chaperones are also abundant proteins, are induced during stress and are important for cell-differentiation [65]. Thus, there is a general overlap of catalases and molecular chaperones under stress conditions and the cell differentiation processes of microorganisms, features that would give them a great endurance for survival.

#### Author contributions

TN-R performed the experiments, contributed to experimental design and analysis of data. WH conceived the study, contributed to experimental design and interpretation, and was responsible for writing the manuscript.

#### Funding

This work was supported in part by PAPIIT (UNAM) grant IN208717 to WH.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

#### Acknowledgements

Teresa Nava Ramírez is a doctoral student from Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received the fellowship 480865, CVU501149 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

We are grateful to Juan Manuel Barbosa-Castillo for maintaining our computers and Manuel Ortíz Benavides for keeping our incubators working. We acknowledge the Unidad de Cómputo, the Unidad de Biología Molecular and the Taller de Mantenimiento of our Institute for continuous assistance and excellent services.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.05.020>.

#### References

- [1] L. Heidens, S.T. van Genesen, Hanssen LLP, N.H. Lubsen, Protein refolding in peroxisomes is dependent upon an HSP1-regulated function, *Cell Stress & Chaperones* 17 (2012) 603–613.
- [2] A. Yu, P. Li, T. Tang, J. Wang, Y. Chen, L. Liu, Roles of Hsp70s in stress responses of microorganisms, plants, and animals, *Bio. Med. Res. Int.* 510319 (2015).
- [3] F. Faria-Oliveira, J. Carvalho, C. Ferreira, M.L. Hernández, C. Gil, C. Lucas, Quantitative differential proteomics of yeast extracellular matrix: there is more to it than meets the eye, *BMC Microbiol.* 15 (2015) 271.
- [4] Y. Zhang, I. Sinning, S. Rospert, Two chaperones locked in an embrace: structure and function of the ribosome-associated complex RAC, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24 (2017) 611–619.
- [5] S. Meier, S. Bohnacker, C.J. Klose, A. Lopez, C.A. Choe, P.W.N. Schmid, N. Bloemke, F. Rühnógl, M. Haslbeck, J. Esser-von Bieren, M. Sattler, P.S. Huang, M.J. Feige, The molecular basis of chaperone-mediated interleukin 23 assembly control, *Nat. Commun.* 10 (2019) 4121.
- [6] A. Finka, R.U.H. Mattou, P. Goloubinoff, Experimental milestones in the discovery of molecular chaperones as polypeptide unfolding enzymes, *Annu. Rev. Biochem.* 85 (2016) 715–742.
- [7] N.J. Mailliot, F.A. Honoré, D. Byrne, V. Méjean, O. Genest, Cold adaptation in the environmental bacterium *Shewanella oneidensis* is controlled by a J-domain co-chaperone protein network, *Comm Biol* 2 (2019) 323.
- [8] T. Saio, S. Kawagoe, K. Ishimori, C.G. Kalodimos, Oligomerization of a molecular chaperone modulates its activity, *eLife* 7 (2018) e35731.
- [9] R. Shashidharamurthy, H.A. Koteiche, J. Dong, H.S. Mchaourab, Mechanism of chaperone function in small heat shock proteins: dissociation of the HSP27 oligomer is required for recognition and binding of destabilized T4 lysozyme, *J. Biol. Chem.* 280 (7) (2005) 5281–5289.
- [10] Z. Liu, C. Wang, Y. Li, C. Zhao, T. Li, D. Li, S. Zhang, C. Liu, Mechanistic insights into the switch of αB-crystallin chaperone activity and self-multimerization, *J. Biol. Chem.* 293 (38) (2018) 14880–14890.
- [11] G. Chen, A. Abelein, H.E. Nilsson, A. Leppert, Y. Andrade-Talavera, S. Tambano, L. Hemmingsson, F. Roshan, M. Landreh, H. Biverstål, P.J.B. Koerk, J. Presto, H. Hebert, A. Fisahn, J. Johansson, Br12 BRICHOS client specificity and chaperone activity are governed by assembly state, *Nat. Commun.* 8 (2017) 2081.
- [12] W. Hansberg, J. Aguirre, Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen, *J. Theor. Biol.* 142 (1990) 201–221.
- [13] S. Michán, F. Lledías, W. Hansberg, Asexual development is increased in *Neurospora crassa* cat-3-null mutant strains, *Eukaryot. Cell* 2 (2003) 798–808.
- [14] J. Aguirre, M. Rios-Momberg, D. Hewitt, W. Hansberg, Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes, *Trends Microbiol.* 13 (2005) 111–118.
- [15] W. Hansberg, J. Aguirre, M. Rios-Momberg, P. Rangel, L. Peraza, Y. Montes de Oca, N. Cano-Domínguez, Cell differentiation as a response to oxidative stress, *Stress in Yeasts and Filamentous Fungi*, Elsevier Limited, London, 2008.
- [16] R.E. Navarro, M.A. Stringer, W. Hansberg, W.E. Timberlake, J. Aguirre, catA, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase, *Curr. Genet.* 29 (1996) 352–359.
- [17] A. Díaz, P. Rangel, Y. Montes de Oca, F. Lledías, W. Hansberg, Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*, *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001) 1323–1333.
- [18] S. Michán, F. Lledías, J.D. Baldwin, D.O. Narvig, W. Hansberg, Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (2002) 521–532.
- [19] M.G. Klotz, P.C. Loewen, The molecular evolution of catalytic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryotes and from bacteria into eukaryotes, *Mol. Biol. Evol.* 20 (2003) 1098–1112.
- [20] M. Zamocky, B. Gasselhuber, P.G. Furtmüller, C. Obinger, Molecular evolution of hydrogen peroxide degrading enzymes, *Arch. Biochem. Biophys.* 525 (2) (2012) 131–144.
- [21] W. Hansberg, R. Salas-Lizana, L. Domínguez, Fungal catalases: function, phylogenetic origin and structure, *Arch. Biochem. Biophys.* 525 (2012) 170–180.
- [22] O.M. Lardinois, M.M. Mestdagh, P.G. Rouxhet, Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide, *Biochim. Biophys. Acta* 1295 (1996) 222–238.
- [23] A. Díaz, R.A. Muñoz-Clares, P. Rangel, V.J. Valdés, W. Hansberg, Functional and structural analysis of catalase oxidized by singlet oxygen, *Biochimie* 87 (2005) 205–214.
- [24] A. Díaz, V.J. Valdés, E. Rudino-Pinera, E. Horjales, W. Hansberg, Structure-function relationships in fungal large-subunit catalases, *J. Mol. Biol.* 386 (2009) 218–232.
- [25] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
- [26] L. Kawasaki, D. Wyson, R. Diamond, J. Aguirre, Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 3284–3292.
- [27] F. Lledías, P. Rangel, W. Hansberg, Singlet oxygen is part of a hyperoxidant state generated during spore germination, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1396–1404.
- [28] M.A. Noventa-Jordao, R.M. Couto, M.H. Goldman, J. Aguirre, S. Iyer, A. Caplan, H.F. Terezzi, G.H. Goldman, Catalase activity is necessary for heat-shock recovery in *Aspergillus nidulans* germlings, *Microbiology* 145 (1999) 3229–3234.
- [29] S. Bandyopadhyay, M.R. Cookson, Evolutionary and functional relationships within the DJ1 superfamily, *BMC Evol. Biol.* 4 (2004) 4–6.
- [30] M.M. Horvath, N.V. Grishin, The C-terminal domain of HP1 catalase is a member of the type I glutamine amidotransferase superfamily, *Proteins* 42 (2001) 230–236.
- [31] A. Zárate-Romero, V. Stojanoff, A.I. Cohen, W. Hansberg, E. Rudino-Pinera, X-ray driven reduction of Cpd 1 of catalase-3 from *N. crassa* reveals differential sensitivity

- of active sites and formation of ferrous state, Arch. Biochem. Biophys. 666 (2018) 107–115.
- [32] P.C. Loewen, B.L. Triggs-Raine, Genetic mapping of katF, a locus that with katE affects the synthesis of a second catalase species in *Escherichia coli*, J. Bacteriol. 160 (1984) 668–675.
- [33] P.C. Loewen, B.L. Triggs-Raine, C.S. George, B.E. Hrabarchuk, Genetic mapping of katG, a locus that affects synthesis of the bifunctional catalase-peroxidase hydroperoxidase I in *Escherichia coli*, J. Bacteriol. 162 (1985) 661–667.
- [34] J. Horwitz, Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89 (1992) 10449–10453.
- [35] J. Buchner, H. Grallert, U. Jakob, Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein, Methods Enzymol. 290 (1998) 323–338.
- [36] T. Zhang, H.M. Zhou, Comparison of inactivation and unfolding of yeast alcohol dehydrogenase during denaturation in urea solutions, Int. J. Biol. Macromol. 19 (2) (1996) 113–119.
- [37] A. Ayling, F. Baneyx, Influence of the GroE molecular chaperone machine on the in vitro refolding of *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase, Protein Sci. 5 (1996) 478–487.
- [38] N.J. Freehold, V. Worthington (Ed.), Worthington Enzyme Manual, Worthington Biochemical Corporation, 1988, p. 16.
- [39] S.J. Lee, S.J. Kim, I.K. Kim, J. Ko, C.S. Jeong, G.H. Kim, C. Park, S.O. Kang, P.G. Suh, H.S. Lee, S.S. Cha, Crystal structures of human DJ-1 and *Escherichia coli* Hsp31, which share an evolutionarily conserved domain, J. Biol. Chem. 278 (45) (2003) 44552–44559.
- [40] A.J. Weids, S. Istedt, M.J. Tamás, C.M. Grant, Distinct stress conditions result in aggregation of proteins with similar properties, Sci. Rep. 6 (2016) 24554.
- [41] U. Natkańska, A. Skoneczna, M. Skoneczny, Oxidative stress triggers aggregation of GFP-tagged Hsp31p, the budding yeast environmental stress response chaperone, and glyoxalase III, Cell Stress & Chaperones 23 (2018) 595–607.
- [42] P. Chelkani, L.J. Donald, H.W. Duckworth, P.C. Loewen, Hydroperoxidase II of *Escherichia coli* exhibits enhanced resistance to proteolytic cleavage compared to other catalases, Biochemistry 42 (2003) 5729–57318.
- [43] J. Li, J. Liu, G. Wang, J.Y. Cha, G. Li, S. Chen, Z. Li, J. Guo, C. Zhang, Y. Yang, W.Y. Kim, D.J. Yun, K.S. Schumaker, Z. Chen, Y. Guo, A chaperone function of NO CATALASE ACTIVITY1 is required to maintain catalase activity and for multiple stress responses in *Arabidopsis*, Plant Cell 27 (2015) 908–925.
- [44] J. Liu, L. Cui, Z. Xie, Z. Zhang, E. Liu, X. Peng, Two NCA1 isoforms interact with catalase in a mutually exclusive manner to redundantly regulate its activity in rice, BMC Plant Biol. 19 (2019) 105.
- [45] G. Li, J. Li, R. Hao, Y. Guo, Activation of catalase activity by a peroxisome-localized small heat shock protein Hsp17.6CII, J. Genet & Genom. 44 (2017) 395–404.
- [46] M. Mujacic, F. Baneyx, Chaperone Hsp31 contributes to acid resistance in stationary-phase *Escherichia coli*, Appl. Environ. Microbiol. 73 (2007) 1014–1018.
- [47] M. Mujacic, F. Baneyx, Regulation of *Escherichia coli* hchA, a stress-inducible gene encoding molecular chaperone Hsp31, Mol. Microbiol. 60 (6) (2006) 1576–1589.
- [48] A. Skoneczna, A. Miciakiewicz, M. Skoneczny, *Saccharomyces cerevisiae* Hsp31p, a stress response protein conferring protection against reactive oxygen species, Free Radic. Biol. Med. 42 (2007) 1409–1420.
- [49] C.-J. Tsai, K. Aslam, H.M. Drendel, J.M. Asiago, K.M. Goode, L.N. Paul, J.-C. Rochet, T.R. Hazbun, Hsp31 is a stress-response chaperone that intervenes in the protein misfolding process, J. Biol. Chem. 290 (41) (2015) 24816–24834.
- [50] K. Bankapalli, V. Vishwanathan, G. Susarla, N. Sunayana, S.D. Saladi, D. Peethambaram, P. D'Silva, Redox-dependent regulation of mitochondrial dynamics by DJ-1 paralogs in *Saccharomyces cerevisiae*, Redox Biol. 32 (2020) 101451.
- [51] L. Zondler, L. Miller-Fleming, M. Repici, S. Gonçalves, S. Tenreiro, R. Rosado-Ramos, C. Betzer, K.R. Straatman, P.H. Jensen, F. Giorgini, T.F. Outeiro, DJ-1 interactions with  $\alpha$ -synuclein attenuate aggregation and cellular toxicity in models of Parkinson's disease, Cell Death Dis. 5 (2014) e1350.
- [52] A. Lewandowska, T.N. Vo, T.-D.H. Nguyen, K. Wahn, D. Vertommen, F. Van Breusegem, D. Young, J. Messens, Bifunctional chloroplastic DJ-1B from *Arabidopsis thaliana* is an oxidation-robust holdase and a glyoxalase sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Antioxidants 8 (2019) 8.
- [53] L. Miller-Fleming, P. Antas, T.F. Pais, J.L. Smalley, F. Giorgini, T.F. Outeiro, Yeast DJ-1 superfamily members are required for diurnal-shift reprogramming and cell survival in stationary phase, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111 (2014) 7012–7017.
- [54] J.M. Navarro-Llorens, A. Tormo, E. Martínez-García, Stationary phase in gram-negative bacteria, FEMS Microbiol. Rev. 34 (2010) 476–495.
- [55] T. Zakrajšek, P. Raspor, P. Jamnik, *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase as a model organism - characterization at cellular and proteome level, J. Proteomics 74 (2011) 2837–2845.
- [56] J.-Y. Lee, J. Song, K. Kwon, S. Jang, C. Kim, K. Baek, J. Kim, C. Park, Human DJ-1 and its homologs are novel glyoxalases, Hum. Mol. Genet. 21 (14) (2012) 3215–3225.
- [57] M. Mihoub, J. Abdallah, G. Richarme, Protein repair from glycation by glyoxals by the DJ-1 family maillard deglycates, in: H. Ariga, S. Iguchi-Aruga (Eds.), DJ-1/PARK7 Protein, Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 1037, Springer, Singapore, 2017.
- [58] K.P. Subedi, D. Choi, I. Kim, B. Min, C. Park, Hsp31 of *Escherichia coli* K-12 is glyoxalase III, Mol. Microbiol. 81 (4) (2011) 926–936.
- [59] A. Andreeva, Z. Beldkhozin, N. Omertassova, T. Baizhumanov, G. Yeltay, M. Akhmetali, D. Tolbazar, D. Utebergenov, Apparent deglycase activity of DJ-1 results from the conversion of free methylglyoxal present in fast equilibrium with hemithioacetals and hemiaminals, J. Biol. Chem. 294 (49) (2019) 18863–18872.
- [60] A. Malki, T. Caldas, J. Abdallah, R. Kern, V. Eckey, S.J. Kim, S.S. Cha, H. Mori, G. Richarme, Peptidase activity of the *E. coli* Hsp31 chaperone, J. Biol. Chem. 280 (15) (2005) 14420–14426.
- [61] Q. Zhao, Y. Su, Z. Wang, C. Chen, T. Wu, Y. Huang, Identification of glutathione (GSH)-independent glyoxalase III from *Schizosaccharomyces pombe*, BMC Evol. Biol. 14 (2014) 86.
- [62] S.G. Rhee, H.A. Woo, D. Kang, The role of peroxiredoxins in the transduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signals, Antioxidants Redox Signal. 28 (7) (2018) 537–557.
- [63] H.H. Jang, K.O. Lee, Y.H. Chl, B.G. Jung, S.K. Park, J.H. Park, J.R. Lee, S.S. Lee, J.C. Moon, J.W. Yun, Y.O. Choi, W.Y. Kim, J.S. Kang, G.W. Cheong, D.J. Yun, S.G. Rhee, M.J. Cho, S.Y. Lee, Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function, Cell 117 (2004) 625–635.
- [64] S.Y. Kim, S.K. Paeng, G.M. Nawkar, P. Maibam, E.S. Lee, K.-S. Kim, D.H. Lee, D.-J. Park, S.B. Kang, M.R. Kim, J.H. Lee, Y.H. Kim, W.Y. Kim, C.H. Kang, The 1-Cys peroxiredoxin, a regulator of seed dormancy, functions as a molecular chaperone under oxidative stress conditions, Plant Sci. 181 (2011) 119–124.
- [65] D. Lanneau, A. de Thonel, S. Maurel, C. Didelot, C. Garrido, Apoptosis versus cell differentiation, Prion 1 (1) (2007) 53–60.

### PUBLICACIÓN CONTINUA

---

ARTÍCULO DE REVISIÓN

© 2020 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.  
Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).  
TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 23: 1-13, 2020.  
<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.234>

### Características comunes de las chaperonas pequeñas y diméricas

**Teresa Nava Ramírez y Wilhelm Hansberg\***

Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular,  
Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM. Circuito exterior s/n, Ciudad  
Universitaria, Colonia UNAM, Alcaldía Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, México.  
E-mails: [tnava@ifc.unam.mx](mailto:tnava@ifc.unam.mx), [whansberg@ifc.unam.mx](mailto:whansberg@ifc.unam.mx)

#### RESUMEN

Las chaperonas moleculares constituyen un mecanismo importante para evitar la muerte celular provocada por la agregación de proteínas. Las chaperonas independientes del ATP son un grupo de proteínas de bajo peso molecular que pueden proteger y ayudar a alcanzar la estructura nativa de las proteínas desplegadas o mal plegadas sin necesidad de un gasto energético. Hemos encontrado que el dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande tiene actividad de chaperona. Por ello, en esta revisión analizamos las características más comunes de las chaperonas pequeñas y más estudiadas como:  $\alpha$ B-cristalina, Hsp20, Spy, Hsp33 y Hsp31. En particular, se examina la participación de los aminoácidos hidrofóbicos y de los aminoácidos con carga en el reconocimiento de las proteínas sustrato, así como el papel que tiene la forma dimérica y su oligomerización en la actividad de chaperona. En cada una de esas chaperonas revisaremos la estructura de la proteína, su función, localización celular e importancia para la célula.

**Palabras clave:** chaperonas moleculares, independientes de ATP, mecanismo de acción, dímero, oligomerización.

#### Common characteristics of small dimeric chaperones

#### ABSTRACT

Molecular chaperones constitute an important mechanism to prevent cell death caused by protein aggregation. ATP-independent chaperones are a group of low molecular weight proteins that can protect or restore the native structure of unfolded or mis-folded proteins without expenditure of energy. Because we recently found that the C-terminal domain of large-size subunit catalases has a chaperone activity, we are reviewing common characteristics of the most studied low molecular size chaperones, such as  $\alpha$ B-crystalline, Hsp20, Spy, Hsp33 and Hsp31. We particularly examine the participation of hydrophobic and charged amino acid residues in protein substrate recognition and the role of dimer formation and its oligomerization in the molecular chaperone activity. We review for each of these molecular chaperones its protein structure, its cellular function and localization, and its importance for the cell.

**Keywords:** molecular chaperones, ATP-independent, mechanisms of action, dimers, oligomerization.

---

Artículo recibido el 16 de mayo del 2020.  
Artículo aceptado el 02 de julio del 2020.

---



## INTRODUCCIÓN

**L**a agregación de proteínas debido a la pérdida de la estructura funcional es una de las causas del daño que puede conducir a la muerte celular. Las células tienen diferentes mecanismos para contrarrestar el daño inminente. Uno de los más importantes lo constituyen las chaperonas moleculares que se pueden definir como cualquier proteína que interactúa, estabiliza o ayuda a otra proteína mal plegada o parcialmente desplegada a adquirir su conformación nativa (Hartl & Hayer-Hartl, 2009). Las chaperonas también son esenciales durante la traducción para el plegamiento *de novo* de las proteínas, para el transporte a través de las membranas de los diferentes compartimentos celulares, en la degradación de las proteínas agregadas y en la retención en el citoplasma de algunos factores de transcripción (Hall, 2019; Hartl, Bracher & Hayer-Hartl, 2011; Kriegenburg *et al.*, 2014; Morimoto, 2002).

Inicialmente fueron descritas como proteínas de respuesta al estrés calórico (Heat Shock Proteins, HSP), pero actualmente se sabe que pueden ser inducidas con diferentes tipos de estrés, como: el osmótico, el oxidante, el frío, o la falta de nutrientes, entre otros (Hartl *et al.*, 2011). Sin embargo, no todas las chaperonas se inducen en condiciones de estrés. Las características que las describen de mejor manera son: su presencia en diferentes compartimentos celulares así como en el medio extracelular, su abundancia y gran capacidad para interactuar con diversas proteínas sin que la interacción dependa de dominios o secuencias específicas (Hartl *et al.*, 2011; Macario, Conway de Macario & Cappello, 2013).

Las chaperonas moleculares se pueden dividir según su dependencia de energía en dos grandes grupos: las que dependen del ATP y las independientes del ATP (Hiller & Burmann, 2018; Suss & Reichmann, 2015). Las chaperonas dependientes del ATP emplean ciclos de hidrólisis del ATP junto con grandes cambios conformacionales para reconocer, replegar y liberar sus proteínas sustrato. Son proteínas de peso molecular alto y forman oligómeros para realizar su actividad de chaperona; los ejemplos más estudiados son Hsp60 (GroEL/ES), Hsp70/Hsp110 (DnaK), Hsp104 (ClpB) y Hsp90 (HtpG) (Hartl *et al.*, 2011; Hiller & Burmann, 2018).

Las chaperonas independientes del ATP tienen en común la característica de prevenir la agregación y en algunos casos ayudar a plegar las proteínas sin necesidad de recurrir a un gasto energético. Además, pueden presentar alguna actividad catalítica de manera independiente a su función de chaperona, como la de proteasa o de isomerasa (Hall, 2019; Suss & Reichmann, 2015). Estas chaperonas constituyen un grupo diverso y ubicuo de proteínas que tienen un peso molecular entre los 12 a los 43 kDa (Jaspard & Hunault, 2016).

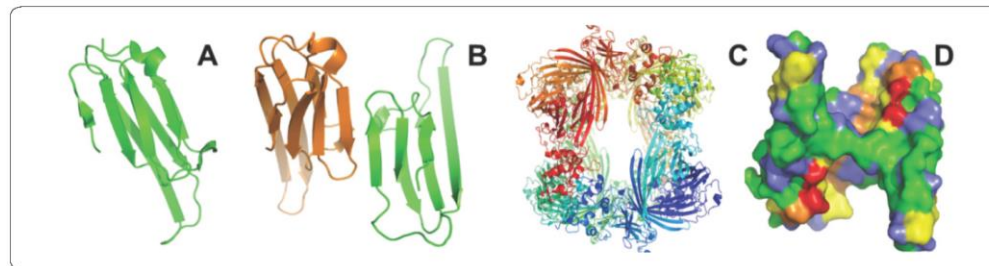
Debido a su bajo peso molecular, dichas chaperonas han sido muy estudiadas para tratar de dilucidar su mecanismo de

acción, ya que permiten el uso de técnicas como NMR, SAXS, FRET y espectrometría de masas combinada con métodos computacionales para su estudio (Suss & Reichmann, 2015). El mecanismo de acción de estas chaperonas es similar entre ellas a pesar de la diversidad estructural que presentan. Se basa principalmente en la unión de superficies hidrófobas flexibles con las superficies hidrófobas expuestas de la proteína sustrato, junto con interacciones de alta afinidad combinadas con una dinámica de baja afinidad para estabilizar la interacción (Webster, Darling, Uversky & Blair, 2019). La forma dimerica favorece la flexibilidad de la estructura de las chaperonas volviéndolas más dinámicas (Santhanagopalan *et al.*, 2018; Suss & Reichmann, 2015) y en algunos casos, se pueden organizar en oligómeros de dímeros (Saio, Kawagoe, Ishimori & Kalodimos, 2018; Santhanagopalan *et al.*, 2018).

Recientemente hemos descubierto que el dominio C-terminal de las catalasas de subunidad grande tienen actividad de chaperona (Nava Ramírez, 2017; Nava Ramírez & Hansberg, 2020). Este dominio C-terminal se parece en estructura a las chaperonas DJ-1 y Hsp31. En el tetramero de la catalasa los dominios C-terminal están relacionados de manera que forman dos dímeros. Estamos interesados en dilucidar el mecanismo molecular de la actividad de chaperona de esos dominios y si funcionan como dímeros. Por otro lado, en algunas chaperonas de bajo peso molecular se ha visto la importancia para su actividad de algunos aminoácidos hidrofóbicos y de algunos aminoácidos con carga que se encuentran en la superficie de la proteína. El motivo de esta revisión es analizar en las chaperonas de bajo peso molecular la participación de los aminoácidos hidrofóbicos y de los aminoácidos con carga en el reconocimiento de las proteínas sustrato, así como el papel de la forma dimerica y de su oligomerización en la actividad de chaperona. Revisaremos las chaperonas más estudiadas como son: las chaperonas pequeñas del estrés calórico (sHSP por sus siglas en inglés), la  $\alpha$ B-cristalina y la Hsp20, las bacterianas Spy y Hsp33 y las ubicuas Hsp31. Estas chaperonas forman parte de una red de defensa de las células para el mantenimiento de la homeostasis proteica.

### $\alpha$ B-CRISTALINA (HspB5)

La  $\alpha$ -Básico-cristalina ( $\alpha$ B-cristalina,  $\alpha$ Bc), también llamada HspB5, es una chaperona de 20 kDa perteneciente a la superfamilia de las sHSP en los mamíferos (Gruvberger-Saal & Parsons, 2006). Esta proteína se asocia en solución principalmente como un dímero estable, el cual presenta una mayor actividad de chaperona que el monómero (Muranova & Gusev, 2018). A partir del dímero se pueden formar multímeros que llegan a ser hasta de 40 subunidades (Figura 1 A-C), ya sean homo-oligómeros o hetero-oligómeros con otras sHSP como son las  $\alpha$ A-cristalina ( $\alpha$ Ac), Hsp27, HspB6 y HspB8. En el cristalino del ojo la interacción  $\alpha$ Ac/ $\alpha$ Bc 3:1 es la más abundante (Boelens, 2014).



**Figura 1.** Estructura cristalográfica del dominio sHSP de la chaperona  $\alpha$ B-cristalina de humano. A) Monómero. B) Dímero. C) Oligómero de 24 subunidades, se forma como un dodecámero de dímeros. D) Superficie del dímero. Los aminoácidos hidrofóbicos están marcados en amarillo y los residuos hidrofóbicos que participan en la interacción con el sustrato en color naranja. Los aminoácidos con carga están marcados en verde y los residuos con carga que participan en la interacción con el sustrato en rojo. Los demás aminoácidos se muestran en azul. Código de acceso del PDB: 2wj7 para el panel A, B y D; 2ygd para panel C (Bagnérís *et al.*, 2009; Braun *et al.*, 2011).

La  $\alpha$ Bc se expresa también en los tejidos de diferentes órganos como: el pulmón, el estómago, el colon, la vejiga, el cerebro, el corazón, el músculo esquelético, el hígado, el bazo y el timo (Klemenz, Andres, Fröhli, Schäfer & Aoyama, 1993). En el cristalino del ojo la  $\alpha$ Bc es una de las proteínas más abundantes junto con la  $\alpha$ A-cristalina, ambas representan el ~40% de las proteínas del citoplasma y su estructura confiere la transparencia al cristalino (Gruverberger-Saal & Parsons, 2006). A nivel celular se localiza principalmente en el citoplasma (Brodehl *et al.*, 2017), en la mitocondria (Jin *et al.*, 2008), en la membrana plasmática y en el núcleo (Vos, Kanon & Kampinga, 2009). Durante el estrés por calor la  $\alpha$ Bc se traslada a las estructuras subnucleares conocidas como puntos de “splicing” nuclear, que son zonas donde se realiza el procesamiento del mRNA (Vos *et al.*, 2009). La función que realiza en este sitio es favorecer el plegamiento de las proteínas desnaturalizadas, así como el transporte de la proteína FBX4, una proteína que se requiere para la ubiquitinación de las proteínas y su degradación (Den Engelsman *et al.*, 2004; Vos *et al.*, 2009). La localización en esta zona no depende de la interacción con el DNA o el RNA, sino que se asocia sólo con otras proteínas que están presentes en ese sitio (Den Engelsman *et al.*, 2004).

La estructura de esta chaperona es característica de las sHSP, que en la  $\alpha$ Bc del humano está compuesta de la región N-terminal variable (NTR), que va del aminoácido 1 al 68; el dominio  $\alpha$ -cristalina (ACD), que va del residuo 69 al 150, y la región C-terminal (CTR), del aminoácido 151 al 175 (Dimauro, Antonioni, Mercatelli & Caporossi, 2017). El dominio ACD presenta una estructura de sandwich compuesta por ocho cadenas  $\beta$  antiparalelas conectadas por un bucle interdominio (Figura 1 A, B). Las cadenas  $\beta$ 6/ $\beta$ 7 forman la interfase de la forma dimerica (Bagnérís *et al.*, 2009). En la región CTR hay un motivo IXI/V (I-P-I/V) que también se encuentra en otras sHSP, que tiene la capacidad de interactuar con el surco formado entre las

cadena  $\beta$ 4/ $\beta$ 8 del ACD de otro dímero para la formación de los oligómeros (Dimauro *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018).

La principal función de  $\alpha$ Bc es prevenir la agregación de otras proteínas, como la  $\alpha$ -sinucleína localizada en el cerebro o la proteína Titin en el corazón, entre otras (Boelens, 2014). La zona de interacción con los agregados amiloides incluyen los aminoácidos K90, K92, V93, L94, I124, T134, S135, S136 y L137, pertenecientes a las  $\beta$ 4/ $\beta$ 8, que son también el sitio de interacción con el dominio C-terminal de la proteína que favorece la oligomerización (Liu *et al.*, 2018) (Figura 1 D). Se ha propuesto que el mecanismo de regulación de la actividad de chaperona de esta proteína en los diferentes tejidos es a través de la auto-inhibición por oligomerización, ya que los multímeros presentan una baja actividad de chaperona en condiciones normales, mientras que en el estrés se favorece la disociación de los multímeros en dímeros, dejando libre el surco de las cadenas  $\beta$ 4/ $\beta$ 8, aumentando así su actividad de chaperona (Liu *et al.*, 2018).

### Hsp20 (HspB6)

La Hsp20, también conocida como HspB6, es una chaperona de 17 kDa perteneciente a la familia de chaperonas Hsp20. Esta familia está ampliamente distribuida en procariontes y en eucariontes. Ha sido estudiada principalmente en mamíferos (Li, Xiao, Zhou, Hu & Yang, 2017).

A diferencia de otras sHSP, la HspB6 humana no forma oligómeros grandes sino que forma únicamente dímeros en solución, cuya formación no depende de su concentración o de su estado de fosforilación (Weeks *et al.*, 2014). Aunque en la rata se ha observado que se forman oligómeros de dos tipos (van de Klundert *et al.*, 1998): la forma dimerica que presenta actividad de chaperona comparable con otras sHSP y las formas oligoméricas que tienen baja actividad de chaperona

(Dreiza *et al.*, 2010; van de Klundert *et al.*, 1998). La HspB6 puede interaccionar con la HspB5 o con la HspB1 y formar hetero-oligómeros que pueden ir de los 100 a los 300 kDa. Esta oligomerización depende de la temperatura y del estado de fosforilación de las sHSP (Bukach, Seit-Nebi, Marston & Gusev, 2004; Seit-Nebi & Gusev, 2009). Por otro lado, la formación de hetero-oligómeros regula la actividad de las otras sHSP: en el caso de los oligómeros de HspB1 se vuelven más específicos hacia un sustrato, mientras que en el caso de los oligómeros de HspB5 aumentan su actividad, debido a que son especies más pequeñas que sus homo-oligómeros (Mymrikov *et al.*, 2019).

HspB6 se localiza principalmente en el citoplasma (Rembold & Zhang, 2001), aunque su localización cambia con el estrés. Por ejemplo, en condiciones de isquemia, migra del citoplasma a las miofibrillas (Golenhofen, Perng, Quinlan & Drenckhahn,

2004) y con la inhibición del proteosoma, se transfiere al citoesqueleto de actina (Verschuure *et al.*, 2002). Esto sugiere que protege la estructura celular a través de su interacción con los componentes del citoesqueleto (Li *et al.*, 2017). HspB6 está asociada con diferentes tejidos en los que el nivel de su expresión suele ser alto, como en los tejidos del sistema cardiovascular, en el músculo esquelético, en el músculo liso y en el cerebro (Edwards, Cameron & Baillie, 2011). Se ha observado que la concentración de la HspB6 está aumentada en la sangre de pacientes con enfermedades vasculares, ya que inhibe la agregación de las plaquetas (Niwa, Kozawa, Matsuno, Kato & Uematsu, 2000).

La HspB6 humana es una chaperona de 160 residuos (Figura 2 A-C), que presenta una estructura característica de las sHSP, con un dominio conservado ACD rígido (del residuo 61 al 146),

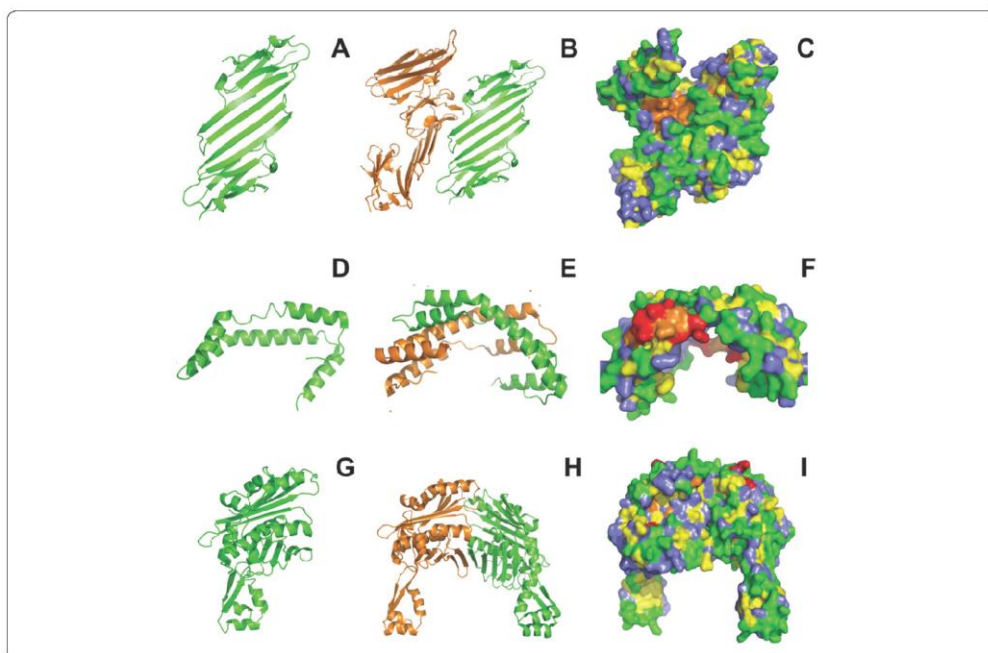


Figura 2. Estructura cristalográfica de la chaperona Hsp20, Spy y Hsp33. Estructuras de Hsp20 o HspB6 de humano A) Monómero. B) Dímero. C) Superficie del dímero. HspB6 puede formar hetero-oligómeros al interaccionar con la HspB5 o con la HspB1, estos oligómeros pueden ir de los 100 a los 300 kDa (Seit-Nebi & Gusev, 2009), sin embargo, no hay estructura cristalográfica de estos. Estructuras de Spy de *E. coli* D) Monómero. E) Dímero. F) Superficie del dímero. Spy es una proteína dimerica, no se ha observado que forme oligómeros. Estructuras de Hsp33 de *Bacillus subtilis*. G) Monómero. H) Dímero. I) Superficie del dímero. Hsp33 es una chaperona dimerica que en su estado oxidado activo puede formar especies oligoméricas con mayor actividad que el dímero (Akhtar *et al.*, 2004), sin embargo, no hay estructura cristalográfica de estas especies. Los aminoácidos hidrofóbicos están marcados según lo indicado en la Figura 1. Código de acceso del PDB: 5lum para los paneles A, B y C (Sluchanko *et al.*, 2017), 3o39 para los paneles D, E y F (Quan *et al.*, 2011), 1vzy para los paneles G, H e I (Janda *et al.*, 2004).



flanqueado por la región NTR (del residuo 1 al 60) variable y el dominio CTR (del residuo 147 al 160) (Fan & Kranias, 2010). Una característica importante de esta chaperona es que su región CTR no presenta el motivo de anclaje IXI/V necesario para la formación de los oligómeros y del dímero en las sHSP (Heirbaut, Beelen, Strelkov & Weeks, 2014). La región CTR no presenta similitud con la secuencia canónica para las sHSP, en vez de ello, cuenta con una secuencia rica en prolina y alanina (Weeks *et al.*, 2014). La dimerización de la HspB6 ocurre por la interacción del surco hidrofóbico de las cadenas  $\beta 4/\beta 8$  con un motivo tripéptido (IPVPV) de la región NTR de otro monómero de la HspB6, que suple la ausencia del motivo de anclaje IXI/V. Esta interacción se puede llevar a cabo con otras sHSP para formar complejos (Heirbaut *et al.*, 2014; Weeks *et al.*, 2014).

La interacción de la HspB6 con las proteínas parcial o completamente desnaturizadas se realiza con los residuos I88, V90, V99, V132, S134 y L156 de las cadenas  $\beta 4/\beta 8$ , como en otras sHSP (Fuchs *et al.*, 2009). Además, la región NTR es importante para la actividad de chaperona, ya que la eliminación total o parcial de los residuos del 21 al 30 y del 41 al 60 disminuye su actividad. Por otro lado, la eliminación de los residuos 31 al 35 mejora la capacidad de chaperona de la HspB6 (Figura 2 C). Esta región está muy conservada en las otras sHSP (Heirbaut *et al.*, 2014).

### Spy

La proteína Spy es una chaperona de 16 a 18 kDa que pertenece a la familia Cpx/Spy, presente en protobacterias, endobacterias y en algunas cianobacterias (Koldewey, Horowitz & Bardwell, 2017; Kwon, Kim, Gross, Gross & Kim, 2010). Es una chaperona dimerica y su dimerización es necesaria para poder interactuar con las proteínas sustrato (He, Sharpe, Mazur & Hiller, 2016). No se ha observado que forme oligómeros en solución.

Spy es una proteína periplásmica y su expresión se regula por los sistemas de dos componentes *Bae* y *Cpx*, que monitorean el plegamiento de las proteínas extra-citoplásmicas (Srivastava, Lambadi, Ghosh, Pathania & Navani, 2014). La expresión de Spy aumenta con la exposición a diferentes tipos de estrés, principalmente el estrés osmótico y por la exposición a agentes que alteran la membrana, como el etanol y los antimicrobianos, y también durante la formación de esferoplastos (Vogt & Raivio, 2012).

Spy tiene la función de evitar la agregación de las proteínas periplásmicas. Debido a la naturaleza permeable de la membrana externa muchas proteínas del periplasma se pueden desnaturizar (Merdanovic, Clausen, Kaiser, Huber & Ehrmann, 2004). La actividad de chaperona de Spy también favorece el plegamiento de las proteínas desplegadas, lo cual es importante debido a la ausencia de chaperonas dependientes del ATP en el periplasma (Koldewey, Stull, Horowitz, Martin & Bardwell, 2016).

La proteína Spy de *Escherichia coli* tiene 161 residuos. La estructura del monómero consiste en cuatro  $\alpha$ -hélices que se estructuran formando una horquilla larga y curvada (Figura 2 D). La estructura se divide en tres regiones. Dos de ellas con un alto grado de desorden: la región 1 o N-terminal, que va de los residuos 1 al 52 (hélice 1, H1), y la región 3 o C-terminal, que va del residuo 144 al 161 (hélice 4, H4); en cambio, la región 2, que va de los residuos 53 al 143 está más estructurada y compuesta por las hélices 2 y 3 (H2 y H3) (Kwon *et al.*, 2010). Las hélices H1 y H2 con la hélice más larga H3 forman dos puntas que están conectadas a través de un asa entre H2 y H3. La formación del dímero se da por la interacción del asa y una región cercana (H2 y el N-terminal de H3) de un monómero con las hélices H3 con H4 del C-terminal de otro monómero, de manera antiparalela. El dímero de Spy tiene una forma ovalada bastante plana y cóncava, parecida a una silla de montar (Figura 2 E). En la región cóncava es donde interaccionan las proteínas sustrato. Esta región tiene cuatro zonas hidrofóbicas rodeadas de aminoácidos hidrofílicos con carga positiva, pertenecientes a la región N-terminal flexible y al asa que conecta H1 con H2 (Koldewey *et al.*, 2017; Kwon *et al.*, 2010; Wu, Stull, Lee & Bardwell, 2019) (Figura 2 F).

La proteína Spy ha sido muy estudiada y sirve como modelo de la interacción chaperona/proteína sustrato. Esto se debe al tamaño pequeño de Spy y a que se han identificado algunos de sus sustratos específicos, como la proteína Im7 (Wu *et al.*, 2019). El mecanismo por el que Spy favorece el plegamiento de otras proteínas se debe a que la proteína sustrato se une a la chaperona a partir de interacciones electrostáticas transitorias de largo alcance. Este complejo se estabiliza mediante interacciones hidrofóbicas de corto alcance, generando el colapso hidrofóbico de la proteína desplegada debido al desplazamiento de las moléculas de agua. Cuando se ocultan los residuos hidrofóbicos de la proteína sustrato la afinidad por Spy disminuye, permitiendo así su liberación (He *et al.*, 2016; Hiller & Burmann, 2018).

### Hsp33

Las Hsp33 son proteínas que van de los 25 a los 33 kDa y pertenecen a la familia Hsp33. Están presentes en la mayoría de los procariontes así como en algunos parásitos eucariontes unicelulares, como los Tripanosomátidos, y también en algunas algas; no se encuentran en animales (Kumsta & Jakob, 2009; Segal & Shapira, 2015). La Hsp33 está normalmente como monómero en solución y es necesario la formación del dímero para su activación; la forma monomérica presenta una actividad de chaperona muy reducida (Chi *et al.*, 2011; Graumann *et al.*, 2001). El dímero en estado oxidado activo puede formar especies oligoméricas con mayor actividad que la especie dimerica (un 85% más eficiente) debido a un aumento significativo en las superficies hidrofóbicas expuestas en las especies oligoméricas, lo cual es relevante durante el estrés oxidante en la célula (Akhtar *et al.*, 2004).



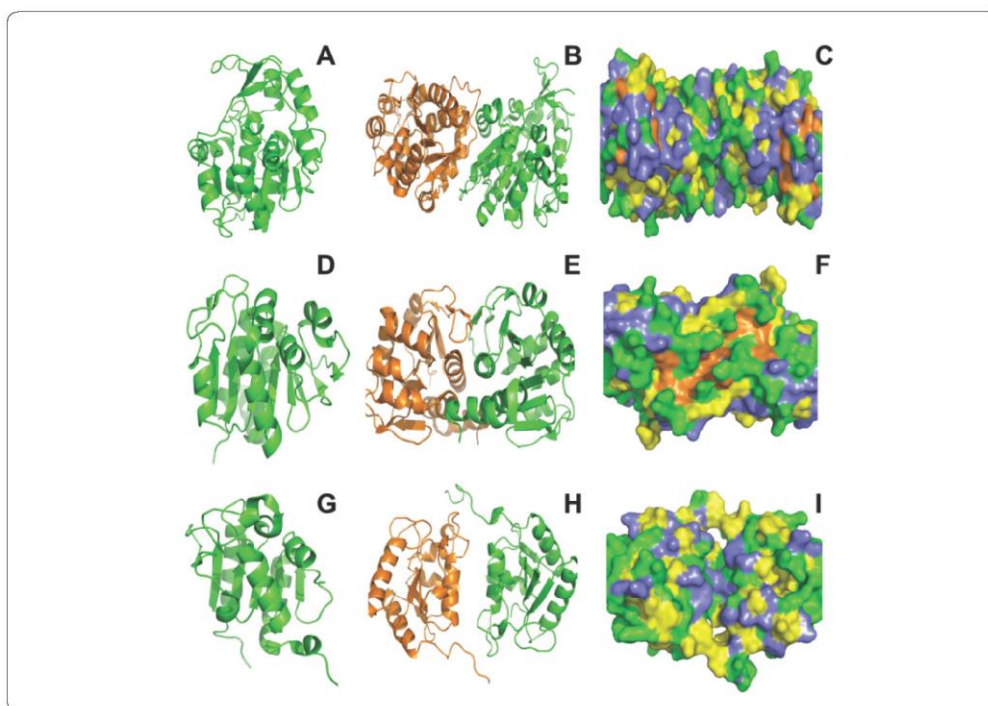


Figura 3. Estructuras cristalográficas de algunas chaperonas de la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI. Estructuras de la Hsp31 de *E. coli*. A) Monómero. B) Dímero. C) Superficie del dímero. Estructuras de la DJ-1 de humano. D) Monómero. E) Dímero. F) Superficie del dímero. Estructuras del dominio C-terminal de la CAT-3 de *N. crassa*. G) Monómero. H) Dímero. I) Superficie del dímero. Los aminoácidos están marcados según lo indicado en la Figura 1. El arreglo de la forma dimerica puede ser empleada para clasificar las chaperonas de esta superfamilia: las que se ensamblan como la Hsp31 y las que lo hacen como la DJ-1 (Wei, Ringe, Wilson & Ondrechen, 2007). Hsp31 de *E. coli* puede generar especies oligoméricas cuando se une el zinc y también con una temperatura mayor a 60°C, formando especies de alto peso molecular (Kim *et al.*, 2018), sin embargo no hay estructura cristalográfica. Código de acceso del PDB: 1izy para los paneles A, B y C (Lee *et al.*, 2003); 1ucf para los paneles D, E y F (Honbou *et al.*, 2003); 3ej6 para los paneles G, H e I (Díaz, Valdés, Rudiño-Piñera, Horjales & Hansberg, 2009).

La Hsp33 se localiza principalmente en el citoplasma donde evita la agregación de proteínas causada por la oxidación o por una temperatura elevada. Por otro lado, en las algas se localiza en los cloroplastos y es inducida cuando hay fotooxidación (Kumsta & Jakob, 2009; Segal & Shapira, 2015). En bacterias su expresión es constitutiva (~1.5  $\mu\text{M}$  en *Escherichia coli*) en ausencia de estrés y aumenta con diferentes tipos de estrés, como el oxidante, el calórico o el causado con el HOCl. En estas condiciones el factor de transcripción  $\sigma^{32}$  determina su expresión y el factor transcripción OxyR la aumenta aún más con el estrés oxidante (Kumsta & Jakob, 2009; Voth & Jakob, 2017).

La Hsp33 de *E. coli* está compuesta por 294 aminoácidos y consta de dos dominios característicos de su estructura, el

dominio de unión al sustrato o N-terminal que va del residuo 1 al 178 y el dominio donde se une el zinc o C-terminal que va del residuo 232 al 294; los dominios están conectados a través de una región de enlace que va del residuo 179 al 231 (Chi *et al.*, 2011; Won *et al.*, 2004) (Figura 2 G, H). La estructura del dominio donde se une el zinc consta de dos hélices que forman un ángulo recto entre sí, además de tener una horquilla de hojas  $\beta$  plegadas y una tercera hélice en el extremo carboxilo. Este dominio presenta un motivo conservado de cuatro cisteínas C-X-C-X<sub>n</sub>-C-X-X-C (232, 234, 262 y 265 en *E. coli*) que incorporan un ion de zinc (Reichmann *et al.*, 2012; Won *et al.*, 2004). En las algas, la Hsp33 perdió la primera cisteína del motivo. Aunque presenta actividad de chaperona y el zinc se sigue uniendo, su capacidad para reconocer los

sustratos está disminuida en comparación con las Hsp33 de las bacterias (Segal & Shapira, 2015). La estructura del dominio que incorpora el zinc tiene un mecanismo de activación que funciona como un interruptor redox: la pérdida del ión de zinc altera la estructura plegada de la proteína, permitiendo que las cisteínas se oxiden formando puentes disulfuro. Esta oxidación provoca la desestructuración de la región de enlace (~40 aminoácidos) que en condiciones normales está plegada, es estable e interacciona con la superficie hidrofóbica del dominio N-terminal (Cremers, Reichmann, Hausmann, Ilbert & Jacob, 2010; Groitl *et al.*, 2016; Won *et al.*, 2004). Para su activación es necesaria la presencia simultánea de agentes oxidantes, como el  $H_2O_2$ , y de una temperatura elevada ( $> 40^\circ C$ ) (Graumann *et al.*, 2001).

La Hsp33 interacciona con las proteínas desplegadas mediante la desestructuración de la región de enlace, lo que la vuelve más flexible y expone los residuos hidrofóbicos esenciales para su interacción con las proteínas sustrato, los cuales están rodeados de residuos polares que participan en la interacción. La zona de interacción más fuerte con las proteínas sustrato involucra a los aminoácidos F157, M172, F187, L202, L203, W212 y Y223, mientras que los aminoácidos Y12 y Y39 del dominio N-terminal presentan un menor número de interacciones (Figura 2I). El dominio C-terminal no está implicado en la unión con las proteínas sustrato (Groitl *et al.*, 2016). La Hsp33 ha sido estudiada como modelo debido a que su función de chaperona se da mediante la interacción entre una región desestructurada de la chaperona con las proteínas sustrato desdobladas.

### Hsp31

Las Hsp31 son proteínas que van de los 25 a los 33 kDa. Pertenecen a la superfamilia de proteínas DJ-1/ThiJ/PfpI que están presentes en los tres dominios de la vida, siendo la proteína DJ-1 humana la más estudiada (Aslam & Hazbun, 2016; Lucas & Marín, 2007). Los miembros de la familia DJ-1 con actividad de chaperona se caracterizan por ser proteínas díméricas y se pueden clasificar según la forma en la que se unen los monómeros en el dímero (Jung *et al.*, 2012; Wei, Ringe, Wilson & Ondrechen, 2007). Algunos miembros de esta superfamilia se organizan en hexámeros cuya unidad principal son dímeros, como el caso de la proteasa PfpI en bacterias, pero no se ha observado que estas proteínas tengan actividad de chaperona (Jung *et al.*, 2012). Las proteínas mutantes de DJ-1 humana que inhiben la formación del dímero carecen de actividad de chaperona y se degradan (Alvarez-Castelao, Sánchez, Goethals, Vandekerckhove & Castaño, 2012; Blackinton *et al.*, 2005). Hsp31 en *E. coli* se oligomeriza cuando incorpora un ión de zinc y también con una temperatura mayor a  $60^\circ C$ , formando especies de alto peso molecular, lo que incrementa significativamente su actividad de chaperona debido al aumento de la zona hidrofóbica expuesta en la superficie del oligómero (Kim *et al.*, 2018).

Las proteínas Hsp31 se localizan principalmente en el citoplasma en condiciones normales, tanto en procariontes como en eucariontes, aunque durante condiciones de estrés también se localizan en los cuerpos P y en los cuerpos de inclusión (Aslam & Hazbun, 2016; Bankapalli *et al.*, 2015). La Hsp31 en las levaduras se transloca del citoplasma a las mitocondrias durante condiciones de estrés, principalmente estrés oxidante, y contribuye a preservar la integridad mitocondrial manteniendo el NADPH y por ende el glutatión (Aslam & Hazbun, 2016; Bankapalli *et al.*, 2015). En humanos, DJ-1 no sólo se localiza en el citoplasma, la mitocondria y los cuerpos de estrés, sino también en el núcleo, en el aparato de Golgi, en el retículo endoplásmico y en las balsas lipídicas de la membrana celular (Kim *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2012; Moutaoufik *et al.*, 2019; Usami *et al.*, 2011).

Aunque en el humano DJ-1 se ha asociado con múltiples funciones (glioxalasa/deglucasa, peptidasa, cofactor transcripcional, oxidoreductasa tipo peroxirredoxina, atrapador de cobre, proteínas de unión a hormonas), aún no está clara su actividad principal en las células. Sin embargo, la actividad de chaperona es importante, ya que en el caso de las mutaciones de DJ-1 que tienen disminuida esta función, aumenta la agregación de proteínas en las células del cerebro, como la  $\alpha$ -sinucleína, asociada con diferentes enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer (Alvarez-Castelao *et al.*, 2012; Dolgacheva, Berezhnov, Fedotova, Zinchenko & Abramov, 2019). La Hsp31 de *E. coli* y las de *Saccharomyces cerevisiae* tienen actividad de desglucasa (glioxalasa) y de chaperona (Aslam & Hazbun, 2016; Bankapalli *et al.*, 2015). Además, en el caso de la Hsp31 de *E. coli* se ha observado *in vitro* que puede ayudar a la recuperación de la forma nativa de las proteínas después de ser desnaturalizadas (Sastri Korotkov, Brodsky & Baneyx, 2002). Las diferentes Hsp31 de *S. cerevisiae* protegen a la célula de la agregación de proteínas y desagregan las fibrillas que se producen durante el estrés oxidante, el osmótico o una temperatura elevada, y también evitan la agregación de la proteína prion Sup35. Además, evaden la toxicidad celular debida a la modificación de las proteínas por el metilglioxal, el glioxal o el ácido acético, producidos en la glicólisis. Se ha visto que están implicadas en la supervivencia de las levaduras durante el crecimiento diauxico y la fase de crecimiento estacionario (Miller-Fleming *et al.*, 2014; Skoneczna, Kaniak & Skoneczny, 2015; Tsai *et al.*, 2015). En *E. coli* la Hsp31 protege a la célula de la toxicidad debida a la agregación de proteínas de manera independiente de otros sistemas de chaperonas, e incrementa la supervivencia de las bacterias cuando el pH del medio se acidifica en la fase estacionaria (Malki, Kern, Abdallah & Richarme, 2003; Mujacic, Bader & Baaneyx, 2004; Mujacic & Baneyx, 2006).

La Hsp31 de *E. coli* consta de 286 aminoácidos y tiene dos dominios característicos en su estructura, el dominio A y el dominio P, que están unidos por un asa de enlace flexible

(Figura 3 A). El dominio A, también llamado dominio ThiJ, tiene una estructura tipo Rossmann que está compuesta por un arreglo de  $\alpha$ -hélices y hojas  $\beta$  antiparalelas. En este arreglo las  $\alpha$ -hélices rodean las hojas  $\beta$  en forma de sandwich. En el dominio A se encuentra la triada catalítica Cys-His-Glu(Asp) característica de la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI; mientras que el dominio P es responsable de la dimerización. El dímero presenta una forma cóncava tipo cuenco en donde hay varios aminoácidos hidrofóbicos rodeados de aminoácidos con carga, los cuales interaccionan con las proteínas sustrato (Lee *et al.*, 2003; Quigley, Korotkov, Baneyx & Hol, 2003, 2004) (Figura 3 B).

La zona de interacción con las proteínas sustrato no ha sido identificada completamente, pero para la Hsp31 de *E. coli* se ha observado una reducción de la actividad de chaperona al mutar algunos aminoácidos hidrofóbicos de la zona del cuenco del dominio A y del asa de enlace. En el dominio A las mutaciones F19E, F20E y Y24E reducen la actividad en un 20% mientras que la mutación L26E la reduce en un 50-60%. Por otro lado, las sustituciones L80E y I220E en el asa reducen la actividad en un 60-65%, mientras que L85E la reduce en un 35% (Figura 3 C). Esto sugiere que la interacción con la proteína sustrato ocurre en la superficie hidrofóbica del cuenco y que la actividad es regulada por el asa de enlace, que normalmente cubre esta zona y con una temperatura elevada ( $> 45^{\circ}\text{C}$ ) se produce un cambio conformacional que flexibiliza el asa y expone la región hidrofóbica (Quigley, Korotkov, Baneyx & Hol, 2004; Sastry, Quigley, Hol & Baneyx, 2004) (Figura 3 C). En el caso de la DJ-1 humana se considera como posible zona de interacción una región hidrofóbica extensa en la superficie de la proteína comprendida por los aminoácidos V146, F162, L166, A167, A178 y L187 (Lee *et al.*, 2003) (Figura 3 D-F).

Las catalasas de subunidad grande (large subunit catalases, LSC) son proteínas presentes en bacterias, hongos y algunas arqueas. A diferencia de otras hemo-catalasas tienen un dominio extra en el extremo carboxilo de entre 100 y 190 aminoácidos (Díaz, Valdés, Rudiño-Piñera, Horjales & Hansberg, 2009; Hansberg, Salas-Lizana & Domínguez, 2012). Este dominio C-terminal se ha incluido en la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI debido a su parecido estructural con estas proteínas, aunque a nivel de secuencia no se parecen y tampoco conservan la triada catalítica característica de la superfamilia (Hansberg, Salas-Lizana & Domínguez, 2012; Lucas & Marin, 2007) (Figura 3 G-I). Se ha observado que el dominio C-terminal le confiere estabilidad a las catalasas en condiciones de estrés calórico (Chelikani, Donald, Duckworth & Loewen, 2003). Hemos descubierto que este dominio C-terminal también presenta actividad de chaperona molecular en condiciones *in vitro* protegiendo a otras proteínas de la desnaturalización debida a una temperatura elevada, a una concentración alta de urea o a la oxidación con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y es más eficiente como chaperona que la Hsp31 de *E. coli* (Nava Ramírez, 2017). El C-terminal aislado de la catalasa-3 de *N. crassa*

confiere a *E. coli* una mayor supervivencia en condiciones de estrés calórico y oxidante (Nava Ramírez & Hansberg, 2020). Algunos datos preliminares indican que varios aminoácidos hidrofóbicos de la superficie del dominio son importantes para su función de chaperona.

#### PARTICIPACIÓN DE ZONAS HIDROFÓBICAS Y AMINO-ÁCIDOS CARGADOS

En todos los casos las zonas de interacción con el sustrato presentan principalmente aminoácidos hidrofóbicos así como algunos aminoácidos con carga que pueden interactuar con la proteína sustrato. En el caso de Spy, el plegamiento de la proteína sustrato depende del desplazamiento de las moléculas de agua desde el interior de la proteína debido a las interacciones hidrofóbicas y a la desestructuración de los aminoácidos de una región mal plegada mediante las interacciones electrostáticas, lo que favorece el plegamiento de la proteína sustrato en su estructura nativa funcional (He *et al.*, 2016; Hiller & Burmann, 2018).

#### LA IMPORTANCIA DE LA ESTRUCTURA DIMÉRICA

En los ejemplos mencionados en esta revisión, la dimerización de las chaperonas es necesaria y en algunos casos, como los de Spy, Hsp33 y Hsp31, es esencial para su actividad. La forma monomérica de este tipo de chaperonas no presenta actividad o es muy reducida. La formación del dímero en las sHSP, Hsp31 y Spy favorece los sitios de unión con la proteína sustrato al aumentar la superficie hidrofóbica, además en Hsp31 y Spy también se favorece la formación de una estructura cóncava que es importante para la interacción con la proteína sustrato (Dreiza *et al.*, 2010; Koldewey *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018; Sastry *et al.*, 2004). En el caso de la Hsp33 la formación del dímero permite la activación por oxidación de la chaperona, esto genera la desorganización de una parte de la proteína y una mayor exposición de la zona hidrofóbica, lo que favorece la interacción con las proteínas sustrato (Groitel *et al.*, 2016).

#### LA OLIGOMERIZACIÓN CONTROLA LA ACTIVIDAD DE CHAPERONA

En los casos de las chaperonas que pueden generar oligómeros el cambio estructural es importante para la regulación de la actividad de chaperona, ya sea de manera negativa o positiva. En la  $\alpha\text{B}$ -cristalina la formación de oligómeros de alto peso molecular regula negativamente su actividad, ya que involucra el surco hidrofóbico formado por las cadenas  $\beta 4/\beta 8$  que es la zona de interacción con las proteínas sustrato. En condiciones de estrés se deshacen los oligómeros y con la exposición del surco hidrofóbico se incrementa la actividad de chaperona (Groitel *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018). En la Hsp31 y la Hsp33 la formación de oligómeros regula de manera positiva su actividad, ya que aumenta la exposición de las zonas hidrofóbicas. En ambos casos se requieren condiciones de estrés para la oligomerización (Akhtar *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2018). En el caso de la Hsp20 (HspB6), aunque no puede



formar homo-oligómeros, la formación de hetero-oligómeros regula su actividad de dos formas dependiendo con cuál de las sHSP interacciona: al unirse con HspB1 se vuelve más específica a un tipo de sustrato y al unirse a HspB5 aumenta su actividad de chaperona en comparación con las especies de homo-oligómeros más grandes de HspB5 (Mymrikov *et al.*, 2019). Esto también ocurre en las chaperonas dependientes del ATP, las cuales forman complejos que potencian su actividad, como es el caso del complejo Hsp40/Hsp70 o las Hsp60 (GroEL en bacterias y TRiC en eucariotes) que se organizan en maquinarias moleculares sumamente complejas (Hartl *et al.*, 2011). Estos datos sugieren que la estructura oligomérica de una chaperona es un aspecto relevante y posiblemente sea un factor determinante para su actividad.

#### AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo en la revisión y los consejos oportunos a Sammy Israel Gutiérrez Terrazas. Teresa Nava Ramírez es alumna de doctorado del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y recibió la beca 480865, CVU501149 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Los proyectos del laboratorio del Dr. Hansberg se han apoyado con recursos del PAPIIT (UNAM), proyecto IN208717.

#### REFERENCIAS

- Akhtar, M. W., Srinivas, V., Raman, B., Ramakrishna, T., Inobe, T., Maki, K., Arai, M., Kuwajima, K. & Rao, C. M. (2004). Oligomeric Hsp33 with enhanced chaperone activity: gel filtration, cross-linking, and small angle x-ray scattering (SAXS) analysis. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(53), 55760–55769. DOI: 10.1074/jbc.M406333200
- Alvarez-Castelao, B., Muñoz, C., Sánchez, I., Goethals, M., Vandekerckhove, J. & Castaño, J. G. (2012). Reduced protein stability of human DJ-1/PARK7 L166P, linked to autosomal recessive Parkinson disease, is due to direct endoproteolytic cleavage by the proteasome. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1823**(2), 524–533. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.11.010
- Aslam, K. & Hazbun, T. R. (2016). Hsp31, a member of the DJ-1 superfamily, is a multitasking stress responder with chaperone activity. *Prion*, **10**(2), 103–111. DOI: 10.1080/19336896.2016.1141858
- Bagnérís, C., Bateman, O., Naylor, C., Cronin, N., Boelens, W., Keep, N. & Slingsby, C. (2009). Crystal structures of a-crystallin domain dimers of aB-crystallin and Hsp20. *Journal of Molecular Biology*, **394**(3), 1242–1252. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.09.060
- 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. DOI: 10.1074/jbc.M115.673624
- Blackinton, J., Ahmad, R., Miller, D. W., van der Brug, M. P., Canet-Avilés, R. M., Hague, S. M., Kaleem, M. & Cookson, M. R. (2005). Effects of DJ-1 mutations and polymorphisms on protein stability and subcellular localization. *Molecular Brain Research*, **134**(1), 76–83. DOI: 10.1016/j.molbrainres.2004.09.004
- Boelens, W. (2014). Cell biological roles of aB-crystallin. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **115**(1), 3–10. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2014.02.005
- Braun, N., Zacharias, M., Peschek, J., Kastenmueller, A., Zou, J., Hanzlik, M., Haslbeck, M., Rappsilber, J., Buchner, J. & Weinkauff, S. (2011). Multiple molecular architectures of the eye lens chaperone alpha beta-crystallin elucidated by a triple hybrid approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**(51), 20491–20496. DOI: 10.1073/pnas.1111014108
- Brodehl, A., Gaertner-Rommel, A., Klauke, B., Grewe, S. A., Schirmer, I., Peterschröder, A., Faber, L., Vorgerd, M., Gummert, J., Anselmetti, D., Schulz, U., Paluszkiwicz, L. & Milting, H. (2017). The novel aB-crystallin (CRYAB) mutation p.D109G causes restrictive cardiomyopathy. *Human Mutation*, **38**(8), 947–952. DOI: 10.1002/humu.23248
- Bukach, O. V., Seit-Nebi, A. S., Marston, S. B. & Gusev, N. B. (2004). Some properties of human small heat shock protein Hsp20 (HspB6). *European Journal of Biochemistry*, **271**(2), 291–302. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2003.03928.x
- 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. DOI: 10.1021/bi034208j
- Chi, S. W., Jeong, D. G., Woo, J. R., Lee, H. S., Park, B. C., Kim, B. Y., Erikson, R. L., Ryu, S. E. & Kim, S. J. (2011). Crystal structure of constitutively monomeric *E. coli* Hsp33 mutant with chaperone activity. *FEBS Letters*, **585**(4), 664–670. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.01.029
- Cremers, C. M., Reichmann, D., Hausmann, J., Ilbert, M. & Jacob, U. (2010). Unfolding of metastable linker region is at the core of Hsp33 activation as a redox-regulated chaperone. *Journal of Biological Chemistry*, **285**(15), 11243–11251. DOI: 10.1074/jbc.M109.084350
- den Engelsman, J., Bennink, E., Doerwald, L., Onnekink, C., Wunderink, L., Andley, U. P., Kato, K., de Jong, W. W. & Boelens, W. C. (2004). Mimicking phosphorylation of the small heat-shock protein aB-crystallin recruits the F-box protein FBX4 to nuclear SC35 speckles. *European Journal of Biochemistry*, **271**(21), 4195–4203. DOI: 10.1111/j.1432-1033.2004.04359.x
- 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. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.12.019

- Dimauro, I., Antonioni, A., Mercatelli, N. & Caporossi, D. (2017). The role of  $\alpha$ B-crystallin in skeletal and cardiac muscle tissues. *Cell Stress and Chaperones*, **23**(4), 491–505. DOI: 10.1007/s12192-017-0866-x
- Dolgacheva, L. P., Berezhnov, A. V., Fedotova, E. I., Zinchenko, V. P. & Abramov, A. Y. (2019). Role of DJ-1 in the mechanism of pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **51**(3), 175–188. DOI: 10.1007/s10863-019-09798-4
- Dreiza, C. M., Komalavilas, P., Furnish, E. J., Flynn, C. R., Sheller, M., Smoke, C. C., Lopes, L. B. & Brophy, C. M. (2010). The small heat shock protein, HSPB6, in muscle function and disease. *Cell Stress and Chaperones*, **15**(1), 1–11. DOI: 10.1007/s12192-009-0127-8
- Edwards, H. V., Cameron, R. T. & Baillie, G. S. (2011). The emerging role of HSP23 as a multifunctional protective agent. *Cell Signalling*, **23**(9), 1447–1454. DOI: 10.1016/j.cellsig.2011.05.009
- Fan, G. C. & Kranias, E. (2010). Small heat shock protein 20 (HspB6) in cardiac hypertrophy and failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **51**(4), 574–577. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2010.09.013
- Fuchs, M., Poirier, D. J., Seguin, S. J., Lambert, H., Carra, S., Charette, S. J. & Landry, J. (2009). Identification of the key structural motifs involved in HspB8/HspB6-Bag3 interaction. *Biochemical Journal*, **425**(1), 245–255. DOI: 10.1042/BJ20090907
- Golenhofen, N., Perng, M. D., Quinlan, R. A. & Drenckhahn, D. (2004). Comparison of small heat shock proteins  $\alpha$ B-crystallin, MKBP, HSP<sub>25</sub>, HSP<sub>20</sub>,  $\alpha$ HSP in heart and skeletal muscle. *Histochemistry and Cell Biology*, **122**(5), 415–425. DOI: 10.1007/s00418-004-0711-z
- Graumann, J., Lilie, H., Tang, X., Tucker, K. A., Hoffmann, J. H., Vijayalakshmi, J., Saper, M., Bardwell, J. C. & Jakob, U. (2001). Activation of the redox-regulated molecular chaperone Hsp33 — A two-step mechanism. *Structure*, **9**(5), 377–387. DOI: 10.1016/s0969-2126(01)00599-8
- Groitel, B., Horowitz, S., Makepeace, K. A. T., Petrotchenko, E. V., Borchers, C. H., Reichmann, D., Bardwell, J. C. A. & Jacob, U. (2016). Protein unfolding as a switch from self-recognition to high-affinity client binding. *Nature Communications*, **7**(1), 1–12. DOI: 10.1038/ncomms10357
- Gruvberger-Saal, S. & Parsons, R. (2006). Is the small heat shock protein  $\alpha$ B-crystallin an oncogene? *The Journal of Clinical Investigation*, **116**(1), 30–32. DOI: 10.1172/JCI27462
- Hall, D. (2019). On the nature of the optimal form of the holdase-type chaperone stress response. *FEBS Letters*, **594**(1), 43–66. DOI: 10.1002/1873-3468.13580
- Hansberg, W., Salas-Lizana, R. & Domínguez, L. (2012). Fungal catalases: function, phylogenetic origin and structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **525**(2), 170–180. DOI: 10.1016/j.abb.2012.05.014
- Hartl, F. U., Bracher, A. & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, **575**(7356), 324–332. DOI: 10.1038/nature10317
- Hartl, F. U. & Hayer-Hartl, M. (2009). Converging concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Nature Structural and Molecular Biology*, **16**(6), 574–581. DOI: 10.1038/nsmb.1591
- He, L., Sharpe, T., Mazur, A. & Hiller, S. (2016). A molecular mechanism of chaperone-client recognition. *Science Advances*, **2**(11), e1601625–e1601629. DOI: 10.1126/sciadv.1601625
- Heirbaut, M., Beelen, S., Strelkov, S. V. & Weeks, S. D. (2014). Dissecting the functional role of the N-terminal domain of the human small heat shock protein HSPB6. *PLoS One*, **9**(8), e105892–e105892. DOI: 10.1371/journal.pone.0105892
- Hiller, S. & Burmann, B. M. (2018). Chaperone–client complexes: a dynamic liaison. *Journal of Magnetic Resonance*, **289**(1), 142–155. DOI: 10.1016/j.jmr.2017.12.008
- Honbou, K., Suzuki, N. N., Horiuchi, M., Niki, T., Taira, T., Ariga, H. & Inagaki, F. (2003). The Crystal structure of DJ-1, a protein related to male fertility and Parkinson's disease. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(33), 31380–31384. DOI: 10.1074/jbc.M305878200
- Janda, I., Devedjiev, Y., Derewenda, U., Dauter, Z., Bielnicki, J., Cooper, D. R., Graf, P. C., Joachimiak, A., Jakob, U. & Derewenda, Z. S. (2004). The crystal structure of the reduced, Zn<sup>2+</sup>-bound form of the *B. subtilis* Hsp33 chaperone and its implications for the activation mechanism. *Structure*, **12**(10), 1901–1907. DOI: 10.1016/j.str.2004.08.003
- Jaspard, E. & Hunault, G. (2016). sHSPdb: A database for the analysis of small Heat Shock Proteins. *BCM Plant Biology*, **16**(1), 135–146. DOI: 10.1186/s12870-016-0820-6
- Jin, J., Whittaker, R., Glassy, M., Barlow, S., Gottlieb, R. & Glembofski, C. (2008). Localization of phosphorylated  $\alpha$ B-crystallin to heart mitochondria during ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **294**(1), H337–H344. DOI: 10.1152/ajpheart.00881.200
- Jung, H. J., Kim, S., Kim, Y. J., Kim, M.-K., Kang, S. G., Lee, J.-H., Kim, W. & Cha, S.-S. (2012). Dissection of the dimerization modes in the DJ-1 superfamily. *Molecules and Cells*, **33**(2), 163–171. DOI: 10.1007/s10059-012-2220-6
- Kim, J., Choi, D., Cha, S. Y., Oh, Y. M., Hwang, E., Park, C. & Ryu, K. S. (2018). Zinc-mediated reversible multimerization of Hsp31 enhances the activity of holding chaperone. *Journal of Molecular Biology*, **430**(12), 1760–1772. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.04.029
- Kim, K. S., Kim, J. S., Park, J.-Y., Suh, Y. H., Jou, I., Joe, E. H. & Park, S. M. (2013). DJ-1 associates with lipid rafts by palmitoylation and regulates lipid rafts-dependent endocytosis in astrocytes. *Human Molecular Genetics*, **22**(23), 4805–4817. DOI: 10.1093/hmg/ddt332
- Kim, S.-J., Park, Y.-J., Hwang, I.-Y., Youdim, M. B. H., Park, K. S. & Oh, Y. J. (2012). Nuclear translocation of DJ-1 during oxidative stress-induced neuronal cell death. *Free Radical*

- Biology & Medicine*, **53**(4), 936–950. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.035
- Klemen, R., Andres, A., Fröhli, E., Schäfer, R. & Aoyama, A. (1993). Expression of the murine small heat shock proteins HSP<sub>25</sub> and alpha B crystallin in the absence of stress. *Journal of Cell Biology*, **120**(3), 639–645. DOI: 10.1083/jcb.120.3.639
- Koldewey, P., Horowitz, S. & Bardwell, J. (2017). Chaperone-client interactions: Non-specificity engenders multifunctionality. *Journal of Biological Chemistry*, **292**(29), 12010–12017. DOI: 10.1074/jbc.R117.796862
- Koldewey, P., Stull, F., Horowitz, S., Martin, R. & Bardwell, J. (2016). Forces driving chaperone action. *Cell*, **166**(2), 369–379. DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.054
- Kriegenburg, F., Jakopc, V., Poulsen, E. G., Nielsen, S. V., Roguev, A., Krogan, N., Gordon, C., Fleig, U. & Hartmann-Petersen, R. (2014). A chaperone-assisted degradation pathway targets kinetochore proteins to ensure genome stability. *PLoS Genetics*, **10**(1), e1004140–e1004140. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004140
- Kumsta, C. & Jakob, U. (2009). Redox-regulated chaperones. *Biochemistry*, **48**(22), 4666–4676. DOI: 10.1021/bi9003556
- Kwon, E., Kim, D. Y., Gross, C. A., Gross, J. D. & Kim, K. K. (2010). The crystal structure *Escherichia coli* Spy. *Protein Sciences*, **19**(11), 2252–2259. DOI: 10.1002/pro.489
- Lee, S.-J., Kim, S. J., Kim, I.-K., Ko, J., Jeong, C.-S., Kim, G.-H., Park, C., Kang, S.-O., Suh, P.-G., Lee, H.-L. & Cha, S.-S. (2003). Crystal structures of human DJ-1 and *Escherichia coli* Hsp31 that share an evolutionarily conserved domain. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(45), 44552–44559. DOI: 10.1074/jbc.M304517200
- Li, F., Xiao, H., Zhou, F., Hu, Z. & Yang, B. (2017). Study of HspB6: insights into the properties of multifunctional protective agent. *Cell Physiology and Biochemistry*, **44**(1), 314–332. DOI: 10.1159/000484889
- Liu, Z., Wang, C., Li, Y., Zhao, C., Li, T., Li, D., Zhang, S. & Liu, C. (2018). Mechanistic insights into the switch of aB-crystallin chaperone activity and self-multimerization. *Journal of Biological Chemistry*, **293**(38), 14880–14890. DOI: 10.1074/jbc.RA118.004034
- Lucas, J. I. & Marin, I. (2007). A new evolutionary paradigm for the Parkinson disease gene DJ-1. *Molecular Biology and Evolution*, **24**(2), 551–556. DOI: 10.1093/molbev/msl186
- Macario, A., Conway de Macario, E. & Cappello, F. (2013). Chaperones: general characteristics and classifications. In *The Chaperonopathies* pp. 15–33. SpringerBriefs in Biochemistry and Molecular Biology, Springer, Dordrecht. DOI: 10.1007/978-94-007-4667-1\_2%0A
- 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. DOI: 10.1016/s0006-291x(02)03053-x
- Merdanovic, M., Clausen, T., Kaiser, M., Huber, R. & Ehrmann, M. (2004). Protein quality control in the bacterial periplasm. *Annual Review of Microbiology*, **65**(1), 149–168. DOI: 10.1146/annurev-micro-090110-102925
- Miller-Fleming, L., Antas, P., Pais, T. F., Smalley, J. L., Giorgini, F. & Outeiro, T. F. (2014). Yeast DJ-1 superfamily members are required for diauxic-shift reprogramming and cell survival in stationary phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**(19), 7012–7017. DOI: 10.1073/pnas.1319221111
- Morimoto, R. (2002). Dynamic remodeling of transcription complexes by molecular chaperones. *Cell*, **110**(3), P281–284. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00860-7
- Moutaoufik, M. T., Maly, R., Amin, S., Zhang, Q., Phanse, S., Gagarinova, A., Zilocchi, M., Hoell, L., Minic, Z., Gagarinova, M., Aoki, H., Stockwell, J., Jessulat, M., Goebels, F., Broderick, K., Scott, N. E., Vlasblom, J., Musso, G., Prasad, B., Lamantea, E., Garavaglia, B., Rajput, A., Murayama, K., Okazaki, Y., Foster, L. J., Bader, G. D., Cayabyab, F. S. & Babu, M. (2019). Rewiring of the human mitochondrial interactome during neuronal reprogramming reveals regulators of the respirasome and neurogenesis. *ISciences*, **19**(27), 1114–1132. DOI: 10.1016/j.isci.2019.08.057
- Mujacic, M., Bader, M. W. & Baneyx, F. (2004). *Escherichia coli* Hsp31 functions as a holding chaperone that cooperates with the DnaK-DnaJ-GrpE system in the management of protein misfolding under severe stress conditions. *Molecular Microbiology*, **51**(3), 849–859. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03871.x
- Mujacic, M. & Baneyx, F. (2006). Regulation of *Escherichia coli* hchA, a stress-inducible gene encoding molecular chaperone Hsp31. *Molecular Microbiology*, **60**(6), 1576–1589. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05207.x
- Muranova, L. & Gusev, N. S. (2018). aB-crystallin phosphorylation: advances and problems. *Biochemistry (Moscow)*, **83**(10), 1196–1206. DOI: 10.1146/annurev-micro-090110-102925
- Mymrikov, E. V., Riedl, M., Peters, C., Weinkauff, S., Haslbeck, M. & Buchner, J. (2019). Regulation of small heat shock proteins by hetero-oligomer formation. *Journal of Biological Chemistry*, **295**(1), 158–169. DOI: 10.1074/jbc.RA119.011143
- Nava Ramírez, T. (2017). *Las catalasas de subunidad grande también son chaperonas*. Tesis de Maestría, UNAM. 1–84
- Nava Ramírez, T. & Hansberg, W. (2020). Chaperone activity of large-size subunit catalases. *Free Radical Biology & Medicine*, **156**, 99–106. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.05.020
- Niwa, M., Kozawa, O., Matsuno, H., Kato, K. & Uematsu, T. (2000). Small molecular weight heat shock-related protein, HSP<sub>20</sub>, exhibits an anti-platelet activity by inhibiting receptor-mediated calcium influx. *Life Sciences*, **66**(1), PL7–12. DOI: 10.1016/s0024-3205(99)00566-4



- Quan, S., Koldewey, P., Tapley, T., Kirsch, N., Ruane, K. M., Pfizenmaier, J., Shi, R., Hofmann, S., Foit, L., Ren, G., Jakob, U., Xu, Z., C., Ygler, M. & Bardwell, J. C. (2011). Genetic selection designed to stabilize proteins uncovers a chaperone called Spy. *Nature Structural and Molecular Biology*, **18**(1), 262–269. DOI: 10.1038/nsmb.2016
- Quigley, P. M., Korotkov, K., Baneyx, F. & Hol, W. G. (2004). A new native EcHsp31 structure suggests a key role of structural flexibility for chaperone function. *Protein Sciences*, **13**(1), 269–277. DOI: 10.1110/ps.03399604
- Quigley, P. M., Korotkov, K., Baneyx, F. & Hol, W. G. J. (2003). The 1.6-Å crystal structure of the class of chaperones represented by *Escherichia coli* Hsp31 reveals a putative catalytic triad. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(6), 3137–3142. DOI: 10.1073/pnas.0530312100
- Reichmann, D., Xu, Y., Cremers, C. M., Ilbert, M., Mittelman, R., Fitzgerald, M. C. & Jakob, U. (2012). Order out of disorder: working cycle of an intrinsically unfolded chaperone. *Cell*, **148**(5), 947–957. DOI: 10.1016/j.cell.2012.01.045
- Rembold, C. M. & Zhang, E. (2001). Localization of heat shock protein 20 in swine carotid artery. *BCM Physiology*, **1**(20), 1–5. DOI: 10.1186/1472-6793-1-10
- Saio, T., Kawagoe, S., Ishimori, K. & Kalodimos, C. (2018). Oligomerization of a molecular chaperone modulates its activity. *ELife*, **7**(e35731), 1–18. DOI: 10.7554/eLife.35731
- Santhanagopalan, I., Degiacomi, M., Shepherd, D., Hochberg, G., Benesch, J. & Vierling, E. (2018). It takes a dimer to tango: oligomeric small heat shock proteins dissociate to capture substrate. *Journal of Biological Chemistry*, **293**(51), 19511–19521. DOI: 10.1074/jbc.RA118.005421
- Sastry, M. S., Korotkov, K., Brodsky, Y. & Baneyx, F. (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. DOI: 10.1074/jbc.M205800200
- Sastry, M. S., Quigley, P. M., Hol, W. G. & 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 of the United States of America*, **101**(23), 8587–8592. DOI: 10.1073/pnas.0403033101
- Segal, N. & Shapira, M. (2015). HSP33 in eukaryotes - an evolutionary tale of a chaperone adapted to photosynthetic organisms. *The Plant Journal*, **82**(5), 850–860. DOI: 10.1111/tpj.12855
- Seit-Neibi, A. S. & Gusev, N. B. (2009). Versatility of the small heat shock protein HSPB6 (Hsp20). *Cell Stress and Chaperones*, **15**(3), 233–236. DOI: 10.1007/s12192-009-0141-x
- Skoneczna, A., Kaniak, A. & Skoneczny, M. (2015). Genetic instability in budding and fission yeast-sources and mechanisms. *FEMS Microbiology Review*, **39**(6), 917–967. DOI: 10.1093/femsre/fuv028
- Sluchanko, N. N., Beelen, S., Kulikova, A. A., Weeks, S. D., Antson, A. A., Gusev, N. B. & Strelkov, S. V. (2017). Structural basis for the interaction of a human small heat shock protein with the 14-3-3 universal signaling regulator. *Structure*, **25**(2), 305–316. DOI: 10.1016/j.str.2016.12.005
- Srivastava, S. K., Lambadi, P. R., Ghosh, T., Pathania, R. & Navani, N. K. (2014). Genetic regulation of spy gene expression in *Escherichia coli* in the presence of protein unfolding agent ethanol. *Gene*, **548**(1), 142–148. DOI: 10.1016/j.gene.2014.07.003
- Suss, O. & Reichmann, D. (2015). Protein plasticity underlines activation and function of ATP-independent chaperones. *Frontiers in Molecular Biosciences*, **2**(43), 1–10. DOI: 10.3389/fmolb.2015.00043
- Tsai, C.-J., Aslam, K., Drendel, H. M., Asiago, J. M., Goode, K. M., Paul, L. N., Rochet, J.-C. & Hazbun, T. R. (2015). Hsp31 is a stress response chaperone that intervenes in the protein misfolding process. *Journal of Biological Chemistry*, **290**(41), 24816–24834. DOI: 10.1074/jbc.M115.678367
- Usami, Y., Hatano, T., Imai, S., Kubo, S., Sato, S., Saiki, S., Fujioka, Y., Ohba, Y., Sato, F., Funayama, M., Eguchi, H., Shiba, K., Ariga, H., Shen, J. & Hattori, N. (2011). DJ-1 associates with synaptic membranes. *Neurobiology of Disease*, **43**(3), 651–662. DOI: 10.1016/j.nbd.2011.05.014
- van de Klundert, F. A., Smulders, R. H., Gijzen, M. L., Lindner, R. A., Jaenicke, R., Carver, J. A. & de Jong, W. W. (1998). The mammalian small heat-shock protein Hsp20 forms dimers and is a poor chaperone. *European Journal of Biochemistry*, **258**(3), 1014–21. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1998.2581014.x
- Verschuure, P., Croes, Y., van den IJssel, P. R., Quinlan, R. A., de Jong, W. W. & Boelens, W. C. (2002). Translocation of small heat shock proteins to the actin cytoskeleton upon proteasomal inhibition. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **34**(2), 117–128. DOI: 10.1006/jmcc.2001.1493
- Vogt, S. L. & Raivio, T. L. (2012). Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response. *FEMS Microbiology Letters*, **326**(1), 2–11. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011.02406.x
- Vos, M., Kanon, B. & Kampinga, H. (2009). HSPB7 is a SC35 speckle resident small heat shock protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1793**(8), 1343–1353. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2009.05.005
- Voth, W. & Jakob, U. (2017). Stress-activated chaperones: a first line of defense. *Trends in Biochemical Sciences*, **42**(11), 899–913. DOI: 10.1016/j.tibs.2017.08.006
- Webster, J. M., Darling, A. L., Uversky, V. N. & Blair, L. J. (2019). Small heat shock proteins, big impact on protein aggregation in neurodegenerative disease. *Frontiers in Pharmacology*, **10**(1047), 1–18. DOI: 10.3389/fphar.2019.01047
- Weeks, S. D., Baranova, E. V., Heirbaut, M., Beelen, S., Shkumatov, A. V., Gusev, N. B. & Strelkov, S. V. (2014).

- 
- Molecular structure and dynamics of the dimeric human small heat shock protein HSPB6. *Journal of Structural Biology*, **185**(3), 342–354. DOI: 10.1016/j.jsb.2013.12.009
- 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), 120–126. DOI: 10.1371/journal.pcbi.0030010
- Won, H. S., Low, L. Y., Guzman, R. D., Martinez-Yamout, M., Jakob, U. & Dyson, H. J. (2004). The zinc-dependent redox switch domain of the chaperone Hsp33 has a novel fold. *Journal of Molecular Biology*, **341**(4), 893–899. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.06.046
- Wu, K., Stull, F., Lee, C. & Bardwell, J. C. (2019). Protein folding while chaperone bound is dependent on weak interactions. *Nature Communications*, **10**(1), 4833. DOI: 10.1038/s41467-019-12774-6
-