



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Sobre-expresión de la catalasa-peroxidasa
de *Neurospora crassa*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

VANESSA VEGA GARCÍA

TUTOR

DR. WILHELM HANSBERG TORRES



MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2007



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del Alumno
Vega
García
Vanessa
59 96 21 08
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
098128659
2. Datos del tutor
Dr
Wilhelm
Hansberg
Torres
3. Datos del sinodal 1
Dr
Alfonso Miguel
Torre
Blanco
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Laura
Kawasaki
Watanabe
5. Datos del sinodal 3
Dr.
Wilhelm
Hansberg
Torres
6. Datos del sinodal 4
Dra.
María Teresa
Lara
Ortíz
7. Datos del sinodal 5
M. en Ing.
José Eduardo
Rodríguez
Bustamante
8. Datos del trabajo escrito
Sobre-expresión de la catalasa-peroxidasa de Neurospora crassa
48 p.
2007

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Wilhelm Hansberg Torres en el laboratorio 103 oriente del Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco el apoyo técnico del Dr. Pablo Rangel Silva y de la Biól. Alma Olivia Sánchez en la realización de este trabajo.

Asimismo, agradecemos el apoyo financiero aportado con las subvenciones IN228405 del PAPIIT/UNAM y C01-40697 del CONACYT.

ÍNDICE

RESUMEN	1
Lista de abreviaturas	2
I. INTRODUCCIÓN	
La tensión oxidante y la diferenciación celular	3
La diferenciación celular en el hongo <i>Neurospora crassa</i>	5
Las especies reactivas del oxígeno	7
La producción de especies reactivas del oxígeno en los sistemas biológicos	7
Mecanismos antioxidantes de las células	9
Las catalasa/peroxidasas	10
El mecanismo catalítico de las catalasa/peroxidasas.....	10
Características de las catalasa/peroxidasas.....	12
Las catalasa/peroxidasas en los hongos	15
La catalasa/peroxidasa de <i>N. crassa</i>	16
II. OBJETIVOS	
Objetivo general.....	22
Objetivos particulares	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
Cepas y plásmidos utilizados.....	23
Condiciones de crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	23
Almacenamiento de las cepas de <i>E. coli</i>	23
Extracción del ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	24
Transformación de una cepa de <i>E. coli</i> competente	24
Amplificación del gen <i>cat-2</i>	24
Construcción del plásmido pQC2-3	25
Análisis del inserto con endonucleasas de restricción	26

Corrección de la mutación introducida por la reacción en cadena de la polimerasa del ADN	26
Sobre-expresión de la CAT-2 en <i>E. coli</i>	26
Mayor expresión de la CAT-2 en presencia de ácido δ -aminolevulínico y de citrato férrico	27
Purificación mediante una cromatografía de afinidad al níquel de la CAT-2 expresada	27
Electroforesis en geles de poliacrilamida	28
Cuantificación de la proteína total en los extractos celulares	30
IV. RESULTADOS	
Inserción de <i>cat-2</i> en el vector de expresión y su verificación	31
Sobre-expresión de la CAT-2 en <i>E. coli</i>	32
Mayor expresión de la CAT-2 en presencia de ácido δ -amino levulínico y de citrato férrico	36
Purificación mediante una cromatografía de afinidad al níquel de la CAT-2 expresada	38
V. DISCUSIÓN	39
VI. CONCLUSIONES	41
VII. PERSPECTIVAS	41
VIII. ANEXO	42
IX. REFERENCIAS	44

RESUMEN

Las catalasas monofuncionales, las peroxidasas y las catalasa/peroxidasas son enzimas que están involucradas en los mecanismos de defensa contra las especies del oxígeno reactivas. Las catalasa/peroxidasas son enzimas bifuncionales, que tienen actividad tanto de catalasa como de peroxidasa. Estas enzimas sólo se han encontrado en eubacterias, en arqueobacterias y en hongos. Se piensa que los hongos adquirieron el gen de la catalasa/peroxidasa por transferencia horizontal de una bacteria. *cat-2* de *Neurospora crassa* es un gen que no tiene intrones y que codifica para una catalasa/peroxidasa (CAT-2) de 753 aminoácidos.

CAT-2 es una enzima citosólica, que se induce durante la fase tardía del crecimiento estacionario, en los conidios y creciendo en una fuente pobre en carbono. A diferencia de otras CP, la CAT-2 tiene una mayor eficiencia catalítica, un pH óptimo más ácido para la actividad de catalasa, una cinética de saturación de dos componentes y es activa a concentraciones molares de peróxido de hidrógeno. La proteína tiene los aminoácidos que son necesarios para la unión del hemo y para la actividad de la enzima y que están conservados en todas las catalasas-peroxidasas.

Para poder estudiar el mecanismo catalítico de la enzima y su estructura, requerimos sobre-expresarla y purificarla en cantidad suficiente y de una manera rápida y eficiente. Para ello amplificamos el marco de lectura abierto del gen *cat-2* con la reacción en cadena de la polimerasa del ADN (PCR, por sus siglas en inglés) y lo clonamos en un vector de sobre-expresión (el pQE30). Este vector tiene el promotor inducible con IPTG de la polimerasa del ARN del fago T5 y los sitios de unión de los ribosomas para asegurar una traducción eficiente del transcrito. Una vez generado el plásmido con el gen insertado (el pQC2-3D), se secuenció el gen para verificar que estuviera libre de mutaciones. Con éste plásmido se transformó la cepa de *Escherichia coli* M15/pREP4 y se observó la expresión de la CAT-2. Se optimizó la expresión de la CAT-2 variando el tiempo de inducción con IPTG y la concentración en el medio del ácido δ -amino levulínico y del hierro, que se requieren para la biosíntesis del hemo.

Lista de abreviaturas

CP	catalasa/peroxidasa
TA	temperatura ambiente
HEPES	ácido N'-2-etanosulfónico
SDS	lauril sulfato de sodio
PMSF	fenil metil sulfonil fluoruro
TEMED	N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamina
p/v	peso sobre volumen
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
IPTG	isopropil β -tiogalactósido
Wt	cepa silvestre
ALA	ácido δ -aminolevulínico
rpm	revoluciones por minuto
pb	pares de bases
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
Ni-NTA	níquel- ácido nitrilo-acético
Nal ^s	sensibilidad a ácido nalidíxico
Str ^s	sensibilidad a estreptomicina
Rif ^s	sensibilidad a rifampicina
Thi ⁻	auxótofa para tiamina y tiazol
Lac ⁻	auxótrofa para lactosa
Ara ⁺	protótrofa para arabinosa
Gal ⁺	protótrofa para galactosa
Mtl ⁻	auxótrofa para manitol
F ⁻	carente de factor F (fertilidad)
RecA ⁺	hace recombinación
Uvr ⁺	repara los daños al ADN con la luz ultravioleta
Lon ⁺	puede lisogenizar

I. INTRODUCCIÓN

La tensión oxidante y la diferenciación celular

La diferenciación celular es un proceso que se lleva a cabo en todos los seres vivos. Está relacionado con distintas formas de crecimiento, la resistencia a condiciones ambientales adversas y con diferentes formas de reproducción. Por ser un proceso vital se regula a muchos niveles, siendo la expresión génica uno de ellos. Sin embargo aún no se cuenta con una teoría general aceptada que explique la diferenciación celular (Hansberg, 1996).

En 1990 Hansberg y Aguirre propusieron que la diferenciación celular es una respuesta al estrés oxidativo. Esta hipótesis considera al crecimiento y estados diferenciados como condiciones estables en las cuales el nivel de las especies de oxígeno reactivas (ERO) es mantenido por un balance entre la generación de las ERO y su eliminación por enzimas antioxidantes. De acuerdo con lo anterior, cuando los niveles de las ERO aumenta por encima de la capacidad antioxidante celular, la célula entra en un estado hiperoxidante. Para compensar este estado hiperoxidante la célula puede: (1) aumentar el poder reductor derivado de los nutrientes y así regresar al estado inicial adaptándose a una condición más oxidante o (2) formar estructuras diferenciadas con las que limita la entrada del dióxígeno. Si la célula no puede adaptarse a las condiciones oxidantes y tampoco puede diferenciarse, muere (Hansberg y Aguirre, 1990).

Esta hipótesis se basó inicialmente en estudios sobre el ciclo asexual (conidiación) de *Neurospora crassa*. Utilizando este modelo experimental, se vio que al inicio de cada una de las transiciones morfogénicas de este proceso de conidiación hay un estado hiperoxidante. Entre las evidencias del estado hiperoxidante están: el incremento en la oxidación de proteínas y enzimas como la sintetasa de glutamina, la deshidrogenasa de glutamato dependiente de NADPH, y las catalasas (Hansberg, 1996; Michan *et al.*, 2002), la pérdida del poder reductor celular (Hansberg, 1996; Toledo *et al.*, 1991), la detección de la quimioluminiscencia producida por algunas ERO y los cambios en los mecanismos antioxidantes (Hansberg *et al.*, 1993). Además, al inicio de la germinación de los conidios hay una producción de oxígeno en singulete (Lledias *et al.*, 1998).

Se ha mostrado en diferentes organismos eucariotes una correlación entre el proceso de desarrollo y la regulación de las enzimas antioxidantes. Así, por ejemplo, las catalasas, son

empleadas de manera regulada bajo condiciones ambientales específicas, en diferentes compartimentos celulares o tipos celulares y etapas del ciclo de vida (Kawasaki *et al.*, 1997; Michan *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 1996; Peraza y Hansberg, 2002; Rubio, 2001).

De acuerdo a esta hipótesis es de esperarse que la falta de enzimas antioxidantes resulte en un aumento en los niveles de las ERO y que esto propicie la diferenciación celular. En *Neurospora* se han obtenido cepas mutantes que anulan la actividad de enzimas antioxidantes y se ha determinado el efecto de estas mutaciones en los procesos de conidiación y en la diferenciación sexual del hongo. La inactivación de la catalasa 3 resulta en un aumento de la oxidación de proteínas, en la producción de carotenos, en la adhesión de hifas y en una producción seis veces mayor en la cantidad de hifas aéreas y de conidios (Michan *et al.*, 2002). Una mutante de la superóxido dismutasa (cobre-zinc) produce más carotenos que una cepa silvestre y tiene alterada la polaridad de los cuerpos fructíferos (Yoshida and Hasunuma, 2004), además que manifiesta una conidiación cíclica.

Además de los cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes hay otras evidencias que relacionan la presencia de las ERO con el desarrollo. Recientemente se encontró que la producción de ERO endógenas por las NADPH oxidasas es esencial para la diferenciación sexual en los hongos *A. nidulans* (Lara-Ortiz *et al.*, 2003), *P. anserina* (Malagnac *et al.*, 2004) y *N. crassa* (Alvarez-Delfin, 2002; Cano, 2006). Así, por ejemplo, en *N. crassa*, la oxidasa del NADPH NOX-1 es esencial para el desarrollo de las estructuras sexuales femeninas y, por su parte, la oxidasa del NADPH NOX-2 es necesaria para la germinación de las ascosporas (Alvarez-Delfin, 2002; Cano, 2006).

En otros sistemas también se ha demostrado que las ERO o la hiperoxia promueven la diferenciación de varios microorganismos tales como, *Volvox*, *Dictyostelium discoideum*, y *Caenorhabditis elegans* (Aguirre *et al.*, 2005) y de varios tipos celulares, por ejemplo: la diferenciación eritroide de las células K562, la diferenciación de las células HL60, la diferenciación osteoclástica de las células HD11EM entre otras (Sauer *et al.*, 2001).

Las evidencias a la fecha indican que las ERO están relacionadas y probablemente son requeridas para la diferenciación celular en células eucariotes. Sin embargo, aún falta por conocer cuáles son los mecanismos relacionados. Una posibilidad es que actúen como moléculas de señalización. Esta idea se apoya en el hecho de que las ERO cumplen con las características para ser consideradas como moléculas de señalización. Son compuestos que

están presentes en todos los tipos celulares, se forman y se desechan rápidamente y algunas se difunden (Aguirre *et al.*, 2005; Bedard y Krause, 2007).

En el laboratorio a cargo del Dr. Wilhelm Hansberg estamos interesados en estudiar los procesos de diferenciación celular en los hongos. Utilizamos *N. crassa* como modelo experimental ya que es un hongo no patógeno y de fácil reproducción, sus procesos de diferenciación celular son rápidos y se pueden inducir de manera sincrónica, sus estadios diferenciados se pueden separar con facilidad y se pueden obtener en cantidad suficiente para realizar un análisis bioquímico. Además actualmente se puede disponer de las herramientas moleculares y genéticas para este hongo, ya que su genoma ha sido secuenciado y se cuenta con gran cantidad de cepas mutantes afectadas en el metabolismo celular o en la diferenciación celular (Borkovich *et al.*, 2004; Galagan *et al.*, 2003).

La diferenciación celular en el hongo *Neurospora crassa*

Neurospora crassa es un hongo filamentoso que pertenece al grupo de los *Ascomycetes*. Tiene un característico color naranja debido a que sintetiza carotenos (Figura 1). *N. crassa* se describió por primera vez en 1843 como un hongo contaminante en las panaderías de París. Se ha utilizado como organismo experimental desde 1920. Como modelo biológico ha contribuido al conocimiento de diversos procesos biológicos, entre ellos, la diferenciación celular. Produce al menos 28 tipos celulares morfológicamente diferentes, muchos de los cuales se derivan de las células somáticas denominadas hifas (Bistis, 2003). Las hifas tienen un crecimiento apical, son multinucleadas, haploides y contienen septos incompletos.



Figura 1. *N. crassa*
(foto FGSC#987)

El proceso de formación de las esporas asexuales llamadas conidios, comprende tres transiciones morfogénicas: las hifas en crecimiento se adhieren y a partir del micelio adherido se desarrollan hifas aéreas especializadas. Estas se ramifican y posteriormente forman los conidios en sus puntas (Figura 2). Los conidios se dispersan y germinan en un medio con nutrientes para formar nuevamente las hifas (Borkovich *et al.*, 2004; Hansberg, 1996).

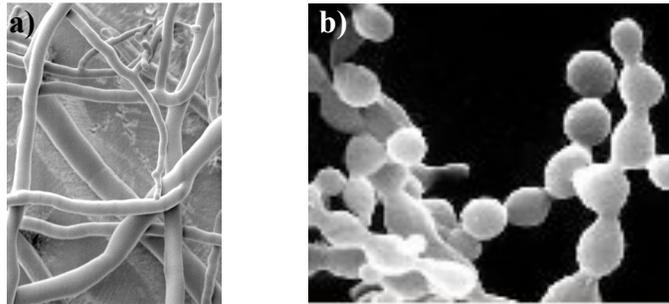


Figura 2. Estructuras diferenciadas del proceso de formación de esporas asexuales en *N. crassa* a) hifas vegetativas (foto Robert Roberson); b) conidios (Raju, 2003)

N. crassa es un hongo heterotálico es decir que tiene dos sexos, los cuales, están determinados genéticamente por los loci *mat-A* y *mat-a*. Cualquiera de los dos sexos puede funcionar como cepa receptora (femenina) o como cepa donadora (masculina) para la formación de las esporas sexuales. Este proceso se induce en un medio restringido de nitrógeno. En estas condiciones se forma una agregación de hifas vegetativas en la cepa receptora que genera una estructura denominada protoperitecio (Figura 3A). El protoperitecio forma tricóginas que, guiadas por las feromonas, van en pos de núcleos del otro sexo. El núcleo masculino migra por la tricógina al interior del protoperitecio donde se divide junto con los núcleos femeninos. La hifa ascógena se septa y forma células con un núcleo de cada sexo. Los núcleos se fusionan dando una célula diploide. Después de la cariogamia se llevan a cabo las dos divisiones meióticas

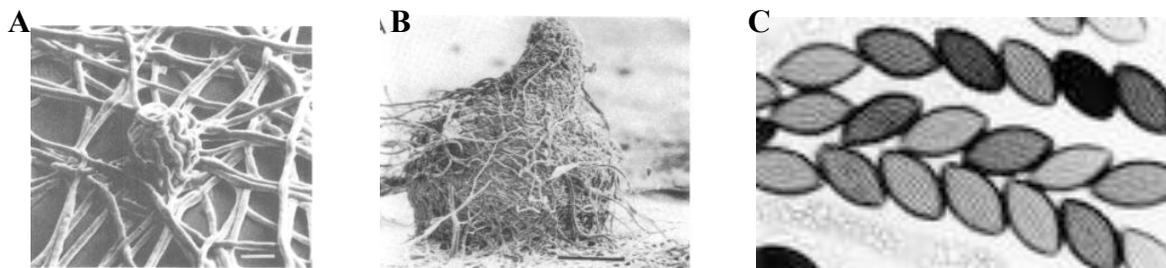


Figura 3. El desarrollo sexual en *N. crassa*

A) protoperitecio (Harris *et al.*, 1975), B) peritecio, (Harris *et al.*, 1975) C) ascosporas (Raju, 2003)

seguidas de una división mitótica por lo que se forman ocho ascosporas dentro del asco. La

estructura que contiene los ascos es el peritecio (Figura 3B). Una vez formadas las ascosporas (Figura 3C) se genera presión dentro del asco de manera que las ascosporas salen disparadas por el agujero (ostiolo) que se encuentra en la punta del peritecio (Raju, 1980).

Las especies reactivas del oxígeno

La mayoría de los organismos utilizan el dióxígeno (O_2) del aire para obtener la energía necesaria y así poder realizar sus funciones vitales. La oxidación (pérdida de electrones) de los compuestos que los seres vivos utilizamos como alimento se emplea para generar dicha energía. Esto ocurre en las mitocondrias mediante un proceso en el que el oxígeno actúa como aceptor final de electrones y es reducido en agua. Dado este uso generalizado se podría considerar al O_2 como un compuesto inocuo, sin embargo, hay muchos datos que indican que el oxígeno también puede ser tóxico. Por ejemplo, que las plantas crezcan mejor en ausencia de O_2 o que muchos organismos se alejen del O_2 y se establezcan dentro de un gradiente de O_2 a una concentración del mismo que sea la adecuada a sus requerimientos y capacidades antioxidantes. La toxicidad del oxígeno se explica debido a la formación de las especies de oxígeno reactivas (ERO) (Hansberg, 2002).

Las ERO son moléculas derivadas del oxígeno que son más reactivas que éste en su estado basal. Son generadas durante el metabolismo celular e incluyen radicales del oxígeno tales como el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($HO\cdot$), el radical peroxilo ($HO_2\cdot$) y el alcoxilo ($RO\cdot$) y moléculas que actúan como agentes oxidantes como el ozono (O_3), el oxígeno en singulete (1O_2) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

La producción de especies reactivas del oxígeno en los sistemas biológicos

Las especies reactivas del oxígeno se generan en las células por varias vías (Figura 4). La mitocondria es el lugar donde se produce la mayor cantidad de ERO. De los electrones que se transfieren en la cadena respiratoria de electrones, aproximadamente el 0.1% salen de ella y pueden reducir parcialmente al oxígeno y generar anión superóxido (O_2^-). Se piensa que esto ocurre principalmente en los complejos I y III de la cadena respiratoria (Inoue *et al.*, 2003; Nohl *et al.*, 2005).

El O_2^- también se puede formar con las enzimas como la oxidasa de la hipoxantina/xantina, las lipooxigenasas o ciclooxigenasas y la oxidasa de NADPH así como por radiación γ y ultravioleta (Kamata y Hirata, 1999).

La dismutación del O_2^- genera el H_2O_2 . Esta dismutación puede ocurrir de manera espontánea, particularmente a bajo pH, o por la acción de la enzima superóxido dismutasa. El H_2O_2 también puede ser formado por enzimas como: las oxidasas de alcoholes, de azúcares, de aminoácidos, del glicolato, del ácido úrico, o bien las enzimas implicadas en las vías metabólicas como la β -oxidación de los ácidos grasos. Recientemente, se ha descubierto que en células animales la interacción de ciertos receptores con sus efectores (como EGF, EGFR, α IL-3, α IL-3R) causa la generación de peróxido de hidrógeno intracelular, el cual podría ser un mediador químico importante en la señalización de estos receptores (DeYulia *et al.*, 2005).

Pese a que el H_2O_2 es una de las ERO menos reactivas, ésta es capaz de inactivar algunas enzimas. Además, puede atravesar las membranas celulares y reaccionar con metales de transición como el Fe^{2+} o el Cu^+ formando el radical hidroxilo, el cual es muy reactivo y puede reaccionar casi con cualquier molécula biológica (Halliwell, 1999).

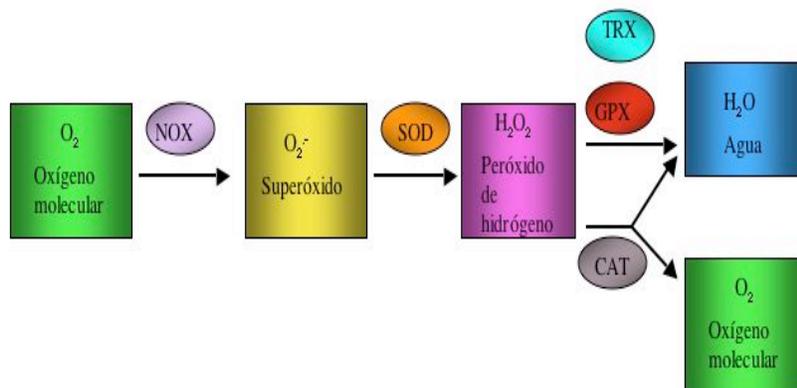


Figura 4. Producción de algunas ERO y principales enzimas antioxidantes

El dióxígeno es reducido a superóxido durante la respiración y a través de la oxidasa de NADPH (NOX). El superóxido reacciona espontáneamente con otra molécula de superóxido o mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD) y genera peróxido de hidrógeno. La catalasa (CAT) descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Otras enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPX) y la peroxirredoxina (PRX) reducen el peróxido de hidrógeno formando en agua utilizando al glutatión (GSH) y la tiorredoxina (Trx), respectivamente, como fuente reductora (Cano, 2006).

Mecanismos antioxidantes de las células

Las ERO tienen la habilidad de interactuar con una gran variedad de moléculas. A través de estas interacciones las ERO pueden destruir o alterar irreversiblemente la función de una molécula blanco. Es por esto que la célula tiene mecanismos para la eliminación de las ERO.

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

Uno de los principales mecanismos antioxidantes que permiten a la célula contender con las ERO lo conforman las enzimas antioxidantes entre las que se incluyen la superóxido dismutasa, las catalasas y las peroxidasas.

Las catalasas son enzimas que dismutan el H_2O_2 directamente en O_2 y dos moléculas de agua. Contienen hemo como grupo prostético. Algunas catalasas son muy resistentes a los agentes desnaturizantes y a los solventes orgánicos (Diaz *et al.*, 2004). Las catalasas tienen un origen en común y están presentes en organismos de los tres dominios de seres vivos: Archea, Eubacteria y Eucariota (Diaz *et al.*, 2005; Klotz y Loewen, 2003).

Las peroxidasas son un grupo extenso y heterogéneo de enzimas que se encargan de catalizar la reducción de los peróxidos, entre ellos el H_2O_2 . Las hemo-peroxidasas utilizan el hemo como grupo prostético pero otras peroxidasas usan átomos de vanadio o de selenio y otras usan residuos de cisteínas en su mecanismo de acción. Entre las familias de peroxidasas más importantes se encuentran las glutatión peroxidasas, que reducen peróxidos o proteínas utilizando el glutatión, las peroxirredoxinas o tiorredoxina peroxidasas, que reducen los peróxidos a partir de electrones provenientes del NADPH a través de la tiorredoxina y de la tiorredoxina reductasa y las haloperoxidasas que oxidan átomos de halógenos y que resulta en la halogenación de diversos compuestos orgánicos (Littlechild, 1999).

Las hemo-peroxidasas se dividen en dos grandes superfamilias, la de las hemo-peroxidasas de animales y la de las peroxidasas de plantas, hongos y bacterias. Esta última superfamilia se ha dividido además en tres clases (clase I, II y III) de acuerdo con su localización celular y su función (Welinder, 1992). Así la lignina-peroxidasa y las peroxidasas de manganeso pertenecen a la clase II, la citocromo *c* peroxidasa, la ascorbato

peroxidasa y la catalasa/peroxidasa pertenecen a la clase I y las peroxidases de secreción de las plantas, como la peroxidasa de raíz fuerte, pertenecen a la clase III.

Las catalasa/peroxidases

Las catalasa/peroxidases (CP) son enzimas bifuncionales que puede llevar a cabo de manera eficiente la actividad de catalasa y la actividad de peroxidasa. Estas enzimas han sido encontradas en algunas arqueas, bacterias y hongos (Welinder, 1991). Se han implicado en la virulencia entre especies de los patógenos intracelulares como las *Mycobacteria* incluyendo *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, y *M. avium* (Manca *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 1995). También se han implicado como un factor de virulencia en bacterias patógenas como *E. coli* O137 cepa enterohemorrágica (Brunder *et al.*, 1996), *Legionella pneumophila* (Bandyopadhyay and Steinman, 1998), *Yersinia pestis* (Garcia *et al.*, 1999), *Burkholderia cepacia* (Lefebvre and Valvano, 2001), *Burkholderia pseudomallei* (Loprasert *et al.*, 2003), y *Pseudomonas aeruginosa* (Brown *et al.*, 1995).

El mecanismo catalítico de las catalasa/peroxidases

Las CP son enzimas capaces de reducir el H_2O_2 con un agente reductor externo (actividad de peroxidasa) y también de dismutarlo en H_2O y O_2 (actividad de catalasa) (Long and Salin, 2000). Tanto en la reacción de catalasa como en la reacción de peroxidasa el primer paso de la reacción es el mismo y consiste en la oxidación del hierro del grupo hemo y del anillo porfirínico. Se rompe el enlace oxígeno-oxígeno del peróxido con dos electrones, uno de los oxígenos se protona y se libera una molécula de agua y el otro átomo de oxígeno se coordina con el hierro del grupo hemo (Fig. 5, reacción 1). Para el rompimiento del enlace O-O, se transfieren dos electrones de la enzima, uno proviene del hierro y el otro de la porfirina o de un aminoácido de la proteína. Como resultado se genera una forma de la enzima llamada compuesto I el cual queda formado por un $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ferroxilo y un radical catiónico que puede ser porfirínico, de un aminoácido vecino o una mezcla de ambos.

El siguiente paso consiste en la reducción del compuesto I. En la reacción de catalasa la reducción del compuesto I se lleva a cabo mediante una transferencia de dos electrones a partir de una segunda molécula de peróxido de hidrógeno (Figura 5, reacción 2).

En la reacción de peroxidasa se utiliza un donador de electrones diferente al peróxido

de hidrógeno para la reducción del compuesto I. Este donador de electrones transfiere un solo electrón en dos reacciones secuenciales (Figura 5, reacciones 3 y 4). Así, se genera una segunda forma intermediaria de la enzima que se llama compuesto II, en la que la enzima está parcialmente reducida, pues sólo el radical catiónico queda reducido a su estado inicial. La reacción termina cuando una segunda molécula del donador reduce el compuesto II con lo cual la enzima regresa a su estado férrico (Fe III) y se libera una molécula de dióxígeno (Carpena *et al.*, 2006; Hillar *et al.*, 2000; Zamocky *et al.*, 2001). En las CP la reacción de peroxidasa ocurre en condiciones en las que hay una baja concentración de peróxido de hidrógeno y está presente un donador de electrones apropiado (Hillar *et al.*, 2000).

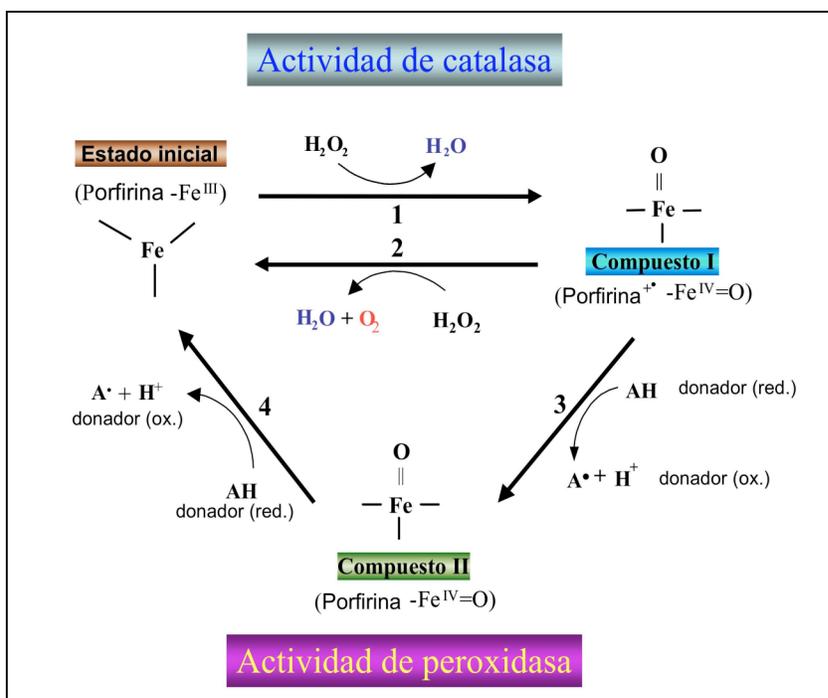


Figura 5. Esquema de la reacción de catalasa/peroxidasa

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

Además de sus actividades de catalasa y de peroxidasa algunas CP como la de *B. pseudomallei* y la de *M. tuberculosis* son capaces de llevar a cabo otro tipo de reacciones de oxido-reducción. Así estas enzimas pueden oxidar lentamente el NADH y también la hidracida del ácido isonicotinoilo y unir el ácido isonicotinoilo del NAD. El isonicotinoilo del NAD, es la forma activa de la isoniazida que se usa contra *Mycobacterium tuberculosis* (Singh *et al.*, 2004).

Características de las catalasa/peroxidasas

La secuencia y la estructura de las CP, no se parecen a las de las catalasas monofuncionales. La secuencia es muy similar a la de las peroxidasas, como la citocromo *c* peroxidasa de hongos (CCP) y a las ascorbato peroxidasas de plantas y por ello se les reconoce como miembros de la clase I de la superfamilia de peroxidasas de plantas, hongos y bacterias (Welinder, 1992). Las CP son las únicas de este grupo que poseen una actividad de catalasa elevada (Zamocky, 2004).

Los genes de las CP están compuestos por dos mitades que son semejantes entre sí y cada uno de estos segmentos es también semejante al gen de la CCP. Además la estructura de cada dominio de las CP se puede modelar con base en la estructura de la CCP. Por esto se ha sugerido que las CP se originaron de la duplicación de un gen de peroxidasa y su fusión posterior. En concordancia con esta idea las CP contienen cerca de 730 aminoácidos y las hemo/peroxidasas de hongos y plantas alrededor de 320 aminoácidos, esto es, las CP contienen cerca del doble de aminoácidos (Welinder, 1991).

Hasta ahora se cuenta con cuatro estructuras cristalográficas de CP: la KatG de *Haloarcula marismortui* (1ITK), (Yamada *et al.*, 2002) la de *Burkholderia pseudomallei* (1MWV), (Carpena *et al.*, 2003), la de *M. tuberculosis* (1SJ2) (Bertrand *et al.*, 2004) y la de *Synechococcus* PCC7942 (1UB2) (Wada *et al.*, 2002). La comparación de estas estructuras cristalográficas muestra que las CP son hemoproteínas diméricas y que los aminoácidos esenciales para la catálisis y la secuencia consenso de unión al grupo hemo sólo están conservados en el dominio N-terminal, por lo que se considera que solo este dominio es catalítico (Figura 6).

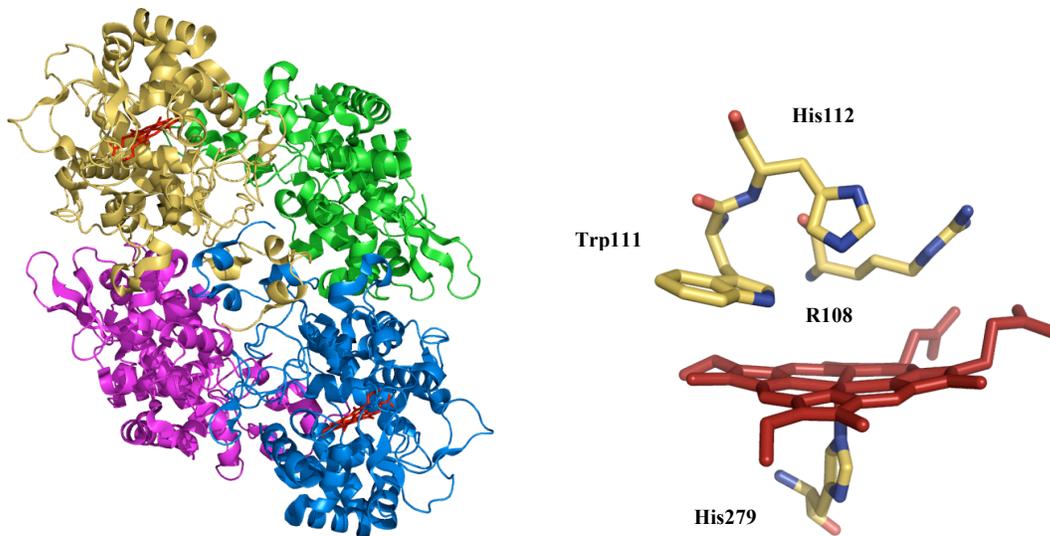


Figura 6. Dominios N- y C- terminales en la estructura de la CP de *B. pseudomallei*

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

La estructuración de los aminoácidos del sitio activo es similar entre las CP, la CCP y la ascorbato peroxidasa. En el extremo distal de la cavidad del hemo se encuentra conservada la triada His/Arg/Trp (His123, Arg119, Trp122 en la CP de *Synechocystis*). De estos residuos, la histidina y la arginina están conservados en el 100% de las secuencias conocidas de enzimas de la clase I y se ha visto que ambos residuos son necesarios para la heterólisis del enlace oxígeno-oxígeno del peróxido de hidrógeno durante la catálisis de las CP. Por su parte, el triptofano está conservado en 100% de las secuencias de CP conocidas y en 98% de las ascorbato peroxidasa. La excepción es la ascorbato peroxidasa de *Mesembryanthemum crystallinum*, la cual tiene una fenilalanina en la posición correspondiente al triptofano (Zamocky *et al.*, 2001). Recientemente, los estudios de mutagénesis han demostrado la importancia que tienen estos aminoácidos para el mecanismo catalítico de las CP. La sustitución de los residuos de arginina o de histidina en las CP de *E. coli* (Zamocky *et al.*, 2001), en la de *Synechocystis* PCC6803 (Regelsberger *et al.*, 2000) y, en la de *M. tuberculosis* (Rouse *et al.*, 1996) resultó en una reducción de la velocidad de formación del compuesto I y como consecuencia en la actividad de catalasa y de peroxidasa. Sin embargo, la sustitución del

triptofano no interfiere en la formación del compuesto I pero es esencial para la reducción del mismo por una segunda molécula de H_2O_2 . Así, las mutantes de triptofano pierden completamente la actividad de catalasa pero retienen la actividad de peroxidasa o incluso esta actividad se incrementa. Esto indica que dicho residuo es indispensable para la actividad de catalasa pero no para la actividad de peroxidasa.

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

Por otra parte en el extremo proximal de la cavidad del hemo se conserva la triada de aminoácidos His/Trp/Asp (His290, Trp341 y Asp402 en la CP de *Synechocystis*). La histidina distal forma el quinto enlace con el hierro del grupo hemo. Este residuo está unido con un puente de hidrógeno al carboxilato de la cadena lateral del aspartato el cual a su vez está unido con un puente de hidrógeno al átomo de nitrógeno del grupo indol del triptofano. La sustitución de estos residuos resulta en una actividad de catalasa menor al 1% de la enzima silvestre, a excepción de la variante W341F, en la que se detectó una actividad de catalasa del 40% y un incremento en la actividad de peroxidasa (Jakopitsch *et al.*, 2002).

El estudio de las estructuras cristalográficas reveló que el dominio C-terminal que, aunque carece del grupo hemo, conserva la arquitectura del sitio activo. Otra particularidad encontrada en las CP son tres asas largas, dos de ellas, las denominadas LL1 y LL2, tienen una secuencia muy conservada y restringen el paso del H_2O_2 al grupo hemo en el lado distal. El LL1 está ubicado entre las llamadas hélices D y E y conecta los dominios catalíticos del dímero. También controla la flexibilidad y el carácter del enlace covalente entre la histidina del lado distal y el Fe III. En este asa se encuentra la tirosina que forma el enlace covalente y

una serie de residuos conservados: Ile248, Asn251, Pro252 y Glu 253, numeración de la CP de *Synechocystis* (Jakopitsch *et al.*, 2005).

El canal de entrada al sitio activo de las CP tiene forma de embudo y en su parte más estrecha hay un aspartato y una serina, que son aminoácidos conservados (Asp152 y Ser335, en la CP de *Synechocystis*). Estos residuos controlan el acceso a los residuos del lado distal de la cavidad del hemo (Arg/His/Trp). El aspartato está conservado sólo en las CP pero no en las CCP, ni en las ascorbato peroxidadas, y participa en la estabilización del asa LL1. La sustitución de este residuo cancela la actividad de catalasa pero no tiene ningún efecto sobre la actividad de peroxidasa. De manera que dicho residuo es importante para la reacción de oxidación del H₂O₂, en el mecanismo catalítico de las CP. (Jakopitsch *et al.*, 2003b).

Las catalasa/peroxidadas en los hongos

Al igual que otros microorganismos, los hongos están expuestos a la acción de las ERO tales como, el superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, provenientes del metabolismo celular o de la actividad respiratoria de las células fagocíticas en el caso de los hongos que son patógenos.

En hongos como: *Penicillium simplicissimum* (Fraaije *et al.*, 1996), *Neurospora crassa* (Peraza y Hansberg, 2002), *Aspergillus nidulans* (Scherer *et al.*, 2002), *Aspergillus fumigatus* (Paris *et al.*, 2003) y recientemente en *Penicillium marneffeii* (Pongpom *et al.*, 2005) se han reportado genes que codifican para una CP. En *Septoria tricci* también se ha reportado una enzima con características semejantes a las catalasa/peroxidadas (Levy *et al.*, 1992).

De las CP de hongos, solo Cat2 de *A. fumigatus* se había mostrado como posible factor de virulencia. Inoculando este hongo en rata se encontró que Cat2 protegía transitoriamente al hongo del estrés oxidativo producido por el huésped (Paris *et al.*, 2003).

cpeA, es el gen que codifica la catalasa/peroxidasa en *A. nidulans*. La transcripción de este gen se induce en condiciones de privación de carbono y durante el desarrollo sexual (Scherer *et al.*, 2002).

Recientemente se aisló el gen *cpeA* que codifica para una catalasa-peroxidasa (CpeA) del hongo patógeno *Penicillium marneffeii*. El transcrito del gen *cpeA* está presente en los conidios, de manera similar a lo que ocurre con *catA* de *A. nidulans*. Se piensa que *P. marneffeii* podría acumular el transcrito de *cpeA* en los conidios por la misma razón propuesta

para la acumulación de CatA de *A. nidullans* en estas estructuras, esto es, para proteger a las germínulas del choque calórico. Se propone que CpeA forma parte del mecanismo que emplea el hongo para sobrevivir al estrés oxidativo dentro del fagosoma del macrófago alveolar. La síntesis elevada del transcrito de *cpeA* en la fase de levadura, que es la forma patógena del hongo, permite la supervivencia del hongo dentro de su huésped (Pongpom *et al.*, 2005). Al igual que en los demás hongos, el gen *cpeA* se expresa durante el desarrollo del hongo.

Las secuencias de CP de los hongos tienen 45-69% de identidad con las secuencias de las CP de bacterias. La identidad entre las secuencias de los hongos es del 80%. Los residuos del sitio activo, tanto los del lado distal del hemo como los del lado proximal, están conservados (Figura 7) (Pongpom *et al.*, 2005).

La catalasa/peroxidasa de *N. crassa*

El gen *cat-2* codifica para una catalasa/peroxidasa denominada catalasa 2 (CAT-2) y se localiza en el contig 3.330 que corresponde al cromosoma VII (Peraza, 2005). La filogenia indica una transferencia lateral del gen de una bacteria a un precursor de los hongos (Klotz and Loewen, 2003; Peraza y Hansberg, 2002). En concordancia con ello, el gen *cat-2* no tiene intrones. El ARNm *cat-2* incluye dos regiones que no son traducidas, una en el extremo 5' de por lo menos 53 pb y otra en el extremo 3' (364 pb) en la que hay una posible secuencia de poliadenilación.

La secuencia de aminoácidos de la CAT-2 es muy similar a la de las otras CP de hongos, ya que entre 65 y 77% los aminoácidos son idénticos (ver la figura 7). Conserva los aminoácidos importantes para la actividad de la enzima (Arg 87, Trp 90, His 91 y Asn 121) y para la coordinación del hemo (His 279, unido al hemo y Asp 389). Estos aminoácidos están presentes sólo en el dominio N-terminal, por lo que sólo este dominio es catalítico.

N. crassa AAL66352 753 aa 1 --MSECPVVR---KSNVGGGGTRNHDWVPAQLRLNLRQHTPVSNPLDKD 44
C. globosum XP_001221369 749 aa 1 --MGECPVN---HANVAGGGTRNNDWVFNQLRLNLRQHQPASSPYSKE 44
M. gisea EDJ99644 750 aa 1 --MGECLPR---TANVAGGGTRNRDWWPNTLKLNLRQHTAETNPYDPN 44
A. fumigatus EAL85001 759 aa 1 MTQDKCPFEKQSSQPNFAGGGTSNKDWWPDRLLKNLNRQHTAVSNPLDAD 50
P. marneffeii AAN04057 748 aa 1 MAESKCPAQHVLRKANVGGAGTSNQDWWPDRLLKNLNRQNNPVSNPLGEE 50
A. nidulans XP_680657 739 aa 1 MGSNECPYSRQ--NANIGGGGQNRDWWPDDLKLNLRQHNVSNPPLDKG 48
* **

N. crassa AAL66352 753 aa 45 FDYAAAFKSLDYEGLKKDLTKLMTDSQDWWPADFGHYGGLFIRMAWHSAG 94
C. globosum XP_001221369 749 aa 45 FDYAAAFKSLDYEGLKKDLITAVMTDSQDWWPADFGHYGGLFIRMAWHSAG 94
M. gisea EDJ99644 750 aa 45 FDYAAAFKSLDYEGLKKDLRALMTDSQEYWPADFGHYGGLFIRMAWHSAG 94
A. fumigatus EAL85001 759 aa 51 FDYAAAFNSLDYEGLKKDLRALMTDSQDWWPADFGHYGGLFIRMAWHSAG 100
P. marneffeii AAN04057 748 aa 51 FDYAAAFNSLDYFALKKDIQDLMTDSQDWWPADFGHYGGLFIRMAWHSAG 100
A. nidulans XP_680657 739 aa 49 FDYTAAFNSLDYFGLKRLDLEALMTDSQDWWPADFGHYGGLFIRMAWHSAG 98

N. crassa AAL66352 753 aa 95 TYRVTDRGRGGGEGQQRFAPLNSWPDNVSLDKARRLLWPIKQKYGNKISW 144
C. globosum XP_001221369 749aa 95 TYRVTDRGRGGGSGQQRFAPLNSWPDNVSLDKARRLLWPKQKYGDKISW 144
M. gisea EDJ99644 750 aa 95 TYRVTDRGRGGGGQQRFAPLNSWPDNVSLDKARRLLWPIKQKYGDKISW 144
A. fumigatus EAL85001 759 aa 101 TYRVTDRGRGGAGGQQRFAPLNSWPDNVSLDKARRLLWPIKQKYGNKISW 150
P. marneffeii AAN04057 748 aa 101 TYRVTDRGRGGGGGQQRFAPLNSWPDNVGLDKARRLLWPIKQKYGDKISW 150
A. nidulans XP_680657 739 aa 99 TYRVTDRGRGGGGQQRFAPLNSWPDNVSLDKARRLLWPIKQKYGSKISW 148

N. crassa AAL66352 753 aa 145 SDLLLLTGVALESMDGFKTFGFAGGRPDTWEADESVYWGAEITWLGNEDR 194
C. globosum XP_001221369 749 aa 145 ADLLLLTGVALESMDGFKTFGFAGGRPDTWEADESAYWGEKPTWLGNDVR 194
M. gisea EDJ99644 750 aa 145 ADLMLLTGVALEDMGFKTFGFAGGRPDTWEADESTYWGGETTWLGNEVR 194
A. fumigatus EAL85001 759 aa 151 ADLLLLTGVALESMDGFKTFGFAGGRPDTWEADEATYWGRETWLGNDAR 200
P. marneffeii AAN04057 748 aa 151 ADLLLLTGVALESMDGFKTFGFSGGRADTWEVDESANWGGETTWLGNDVR 200
A. nidulans XP_680657 739 aa 149 ADLLILAGVALESMDGFKTFGFAGGRSDTWEADQSVFWGGEKEWLGNDVR 198

N. crassa AAL66352 753 aa 195 YSEGQEGHEGHGVVQGDSEKQHTDINHNRDLQSPFLASSHMGLIYVNPEGP 244
C. globosum XP_001221369 749 aa 195 YGQGNQEVAGQGVVDGDESCKGHRDIHSRDLSPFLAAAHMGLIYVNPEGP 244
M. gisea EDJ99644 750 aa 195 YSSGNEGHKESGVIDGSESKKGHKDIHTRDLEKPVSAAHMGLIYVNPEGP 244
A. fumigatus EAL85001 759 aa 201 YAKGFSGSDKRGSLIAD--EESHKTTSHRELETPFLAAAHMGLIYVNPEGP 248
P. marneffeii AAN04057 748 aa 201 YSGG-----KADHKDIHNRDLKPLAAAHMGLIYVNPEGP 235
A. nidulans XP_680657 739 aa 199 YLNG-----ELDNPLAASHMGLIYVNPEGP 223
*

N. crassa AAL66352 753 aa 245 DGIPDPVSAKDIRVTFGRMAMNDEETVALIAGGHSFGKTHGAGPETHHVG 294
C. globosum XP_001221369 749 aa 245 DGIPDPVAAGRDIRTTFGRMAMNDEETVALIAGGHTFGKTHGAAAPAVNV 294
M. gisea EDJ99644 750 aa 245 DGIPDPVAAARDIRTTFRMAMNDEETVALIAGGHTVFGKTHGAAAPSNDVG 294
A. fumigatus EAL85001 759 aa 249 DGNPDPVAAAHDIRDTFGRMAMNDEETVALIAGGHTFGKTHGAAAPADNV 298
P. marneffeii AAN04057 748 aa 236 DGNPDPVIAAAKDIRTTFGRMAMNDEETVALIAGGHTFGKTHGAGPAPDKL 285
A. nidulans XP_680657 739 aa 224 NKNPDPVLAAKDIRITFGRMAMNDEETVALIAGGHTFGKTHGAGPATHLG 273

N. crassa AAL66352 753 aa 295 KEPEAAPTEHQGLGWANSFGQKGPDTITSGLEVTTWTPPTKWGMGYLEY 344
C. globosum XP_001221369 749 aa 295 KEPEAAPLEQQGLGWSNKHGTGKGPDTITSGLEVIWTKPTKWTHNFEY 344
M. gisea EDJ99644 750 aa 295 PEPEAAPTEHQGLGWSNKHGSGKGPDTITSGLEVIWTKPEAKPTMNYLEY 344
A. fumigatus EAL85001 759 aa 299 KEPEAPGLEAQGLGWANKHGSKGPDTITSGLEVTTWTKPTKWNNFEY 348
P. marneffeii AAN04057 748 aa 286 PEPEADMAQQGLGWNTSFKSGKGPDTITSGLEVTTWTKPTKWSNQFLEY 335
A. nidulans XP_680657 739 aa 274 KEPEHGAETLEQGLGWESGFESGTRHAITSGLEVIWTKPTKWSNQFLEY 323
*

N. crassa AAL66352 753 aa 345 LYKFDWEPTKSPAGANQWVAKNAEPTIPDAYDPNKKKLEPMLTTDIALRM 394
C. globosum XP_001221369 749 aa 345 LFKFEWELTKSPAGANQWVAKNTEPIIPDAFDPNKKHLPRMLTTDLALRF 394
M. gisea EDJ99644 750 aa 345 LFKYEWELTKSPAGANQWVAKNAEFTIPDAFDFPSKKHKPRMLTTDLSLRF 394
A. fumigatus EAL85001 759 aa 349 LFKFEWELTKSPAGAHQWVAKNAEIPDAYDASKKHKPTMLTTDLSLRF 398
P. marneffeii AAN04057 748 aa 336 LFRYDWELTKSPAGAHQWVAKNAEAFIPDAFDFPSKKRKPMLTTDLSLRY 385
A. nidulans XP_680657 739 aa 324 LFKYDWELTKSPAGAHQYVAKGVEFFIPDPDFPSIKHPPRMLTTDLSLRY 373

N. crassa AAL66352 753 aa 395 DPAYDKICRDYLANPDKFADAFARAWFKLLHRDMGPRTRWIGPEVPSHIL 444
C. globosum XP_001221369 749 aa 395 DPEYEKISRRFLENPDQFADAFARAWFKLLHRDLGPRSRWLGPPEIPSEVL 444
M. gisea EDJ99644 750 aa 395 DPEYEKISRRFLENPEQFKDAFARAWFKLLHRDMGPRSRWLGPPEVPKTEL 444
A. fumigatus EAL85001 759 aa 399 DPAYEKIARRFLEHPDQFADAFARAWFKLTHRDMGPRARYLGPPEVPSHVL 448
P. marneffeii AAN04057 748 aa 386 DPIYEKISRRFLEHPDQFADAFARAWFKLHRDLGPRALYIGPEVPAEVL 435
A. nidulans XP_680657 739 aa 374 DPEYEKISRRFLENPDQFADAFARAWFKLTHRDVGPVRVLYQGPPEVPSHVL 423

N. crassa AAL66352 753 aa 445 PWEDYIPVVDYQIIDDNDIAALKKEILATGVAPKKLIFVAWSASSFRGS 494
C. globosum XP_001221369 749 aa 445 IWEDPVPVAVNHPLVDEQDVTTLKRAILATGVAPAKLISTAWASASTFRGG 494
M. gisea EDJ99644 750 aa 445 LWEDPIPTPDHPIIDGSDVDSLKKAILATGVAPSKLIQTAWASASTFRGG 494
A. fumigatus EAL85001 759 aa 449 IWQDPIPAVNHPLVDASDIAALKDEILASGVPPRSFISTAWAASASTFRGS 498
P. marneffeii AAN04057 748 aa 436 PWQDVPVAVDHPILSNEDASALKQRILASGVKFPSSLISTAWASASTFRGS 485
A. nidulans XP_680657 739 aa 424 IWQDVPVPLDHPVIDNDIATLKKAILNSGISHTDLFSTAWASASTFRGS 473

N. crassa AAL66352 753 aa 495 DKRGGANGARIRLAPQNEWKVNDPSTLREVLAALESVQKFNDSSSGKK-- 543
C. globosum XP_001221369 749 aa 495 DKRGGANGARIRLAPQKDWKVVNPPQLAEVLKALEGVQAQFNASQSCK-- 543
M. gisea EDJ99644 750 aa 495 DKRGGANGARIRLEPQNKWEVNNPQQLAEVLKALEGVKADFE--KSGKK-- 541

<i>A. fumigatus</i> EAL85001 759 aa	499	DKRGGANGARIRLAPQRDWEVNNQPWLREALSALAEAVQSRFN-ARGDSKK	547
<i>P. marneffeii</i> AAN04057 748 aa	486	DKRGGANGARIRLSQPREWAVNNQPWLRETLVLEAIQKQFNFSQSGGKK	535
<i>A. nidulans</i> XP 680657 739 aa	474	DKRGGANGARIRLSQPKNWKVNSQPWLSESLAALEKIQKQFNDAQSTDKR	523
<i>N. crassa</i> AAL66352 753 aa	544	VSLADLIVLGGVAALEQASG-----LVVPFTPGRNDATQEHTDVHSFTHL	588
<i>C. globosum</i> XP_001221369 749 aa	544	VSLADLIVLGGVAALEQAAAG-----VSVFPFTPGRTDASQEQTEVESFAHL	588
<i>M. gisea</i> EDJ99644 750 aa	542	VSIADLIVLAGVAAVEQAAAG-----VPVPFTPGRGDATTQEQTDVESFTHL	586
<i>A. fumigatus</i> EAL85001 759 aa	548	VSLADLIVLAGCAAVEKAAQDAGHPKVPFVPGRMDASQEEITDVQSFNHM	597
<i>P. marneffeii</i> AAN04057 748 aa	536	VSIADLIVLAGVAAVEKAAARDAGYAVTVFPFTPGRTDASQEQTDVQSFSDM	585
<i>A. nidulans</i> XP 680657 739 aa	524	VSLADLIVLAGAASLEKAAARDAGHNVSVSFTPGRTDATTQEQTDVDSFNLL	573
<i>N. crassa</i> AAL66352 753 aa	589	EPHADGFRFSYGKGTKRVRTEQFLIDRASLLTLSAPELTALIGGLRVLEAN	638
<i>C. globosum</i> XP_001221369 749aa	589	EPHVDGFRFSYGRGTSRVSTEQFLVDRHLLTLTPPELAVLVGGRLVLAN	638
<i>M. gisea</i> EDJ99644 750 aa	587	EPAADAFRNYGKGTSRVTTEQIMVDRAQQLTLTAPELTVLVGGRLVLAN	636
<i>A. fumigatus</i> EAL85001 759 aa	598	EPFADGFRNFAKGPAPRAEHYLVDKAQLLNLSAPEMTVLVGGRLVLTN	647
<i>P. marneffeii</i> AAN04057 748 aa	586	EPIADGFRNYGSSTSRVRAEELIDKAQLLTLSAPELAVLIGGLRVLTN	635
<i>A. nidulans</i> XP 680657 739 aa	574	EPIADGFRNYGRGTPRVLTEDFLIDKAQLLNLSPELTVLIGGLRVLN	623
<i>N. crassa</i> AAL66352 753 aa	639	YDGS SYGVLTKT PGKLTNDYFVNLLDNTAWKAADNEGEVFI GYDRKTHD	688
<i>C. globosum</i> XP_001221369 749 aa	639	YDGS SNGVFTTTPGKLTNDYFVNLLDMATAWKSVD--GEVFEGRNDRKTGE	686
<i>M. gisea</i> EDJ99644 750 aa	637	YDGS SHGVMTDKPGKLTNDFFVTLDPYTSWKSV--GEVFEGRNDRKSG-	683
<i>A. fumigatus</i> EAL85001 759 aa	648	YDGSTHGVTSPGALTNDFVHLLDMNTAWKDVGN-GELFEGRNDRKTGG	696
<i>P. marneffeii</i> AAN04057 748 aa	636	YDGS AHGVFTTQTPGKLTNDFFVNLDMNTAWKSIGG-VDLYEGRNDRKTGA	684
<i>A. nidulans</i> XP 680657 739 aa	624	YDRS NLGVFTTKRPGQLTNDFVNLDMGVMQKPADDTNEIFITGSDRKTGQ	673
<i>N. crassa</i> AAL66352 753 aa	689	KKWTATRADLIFGAHAELRALAEVYAAVDGEEKFKRDFVAAWHKVMNDR	738
<i>C. globosum</i> XP_001221369 749 aa	687	KKWTGTRADLVFGAHAELRAISEVYGS SSGQDKFVKDFVAAWSKVMNDR	736
<i>M. gisea</i> EDJ99644 750 aa	684	KKLTGTRADLVFGSHSELRALAEVYGSADGQKFTKDFVAAWDKVMNDR	733
<i>A. fumigatus</i> EAL85001 759 aa	697	KKWTATRADLVFGSNAELRAIAEVYASNDGDMKFKDFVAAWNKVMNDR	746
<i>P. marneffeii</i> AAN04057 748 aa	685	KKWTATRNLDLVFGSNAELRAIAEVYGS SDGQEKFKDFVAAWDKVMNDR	734
<i>A. nidulans</i> XP 680657 739 aa	674	ARWKASRADLVFGSHAELRAISEVYGS SDGEAKFKDFVAAWEKVSNDR	723
<i>N. crassa</i> AAL66352 753 aa	739	FDLKQEGRGQNAPKL-- 753	
<i>C. globosum</i> XP_001221369 749 aa	737	YDLAQPGSSGPKL---- 749	
<i>M. gisea</i> EDJ99644 750 aa	734	FDVRRGIYDETRLSKSL 750	
<i>A. fumigatus</i> EAL85001 759 aa	747	FDLKGKQ-TIPARL--- 759	
<i>P. marneffeii</i> AAN04057 748 aa	735	FDLKKKQSTSSHRL--- 748	
<i>A. nidulans</i> XP 680657 739 aa	724	FDLKQTLGIAQRIKPKL- 739	

Figura 7. Alineamiento de la CAT-2 con algunas CP representativas de los hongos Encerrados en azul se muestran los aminoácidos del lado distal de la cavidad del hemo y en rojo los aminoácidos del lado proximal. Los asteriscos indican los residuos conservados que forman parte del sitio de coordinación del hemo en las CP. En negritas se muestran algunos aminoácidos conservados e importantes para la actividad catalítica de las CP. El alineamiento se hizo utilizando el programa BioEdit.

Se ha encontrado que en la superficie del dominio N-terminal de las CP hay dos asas que restringen un canal de acceso al sitio activo (Carpena *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2002). De estas, la denominada asa LL1, se encuentra cubriendo la hendidura que se forma entre los dos dominios del monómero de la CAT-2. Un modelo de la estructura tridimensional de la CAT-2, construido con base en la similitud con las proteínas homólogas para las cuales se conoce la estructura (CP de *M. tuberculosis*, *H. marismortui*, *Synecococcus sp*, *B. pseudomallei*, el C-terminal de la HPI de *E. coli*, la CCP de *S. cerevisiae* y la ascorbato

peroxidasa), reveló que la diferencia más notable entre la estructura de la CAT-2 (Figura 8) con respecto a la de las otras CP es una extensión adicional en dicha asa. Esta extensión se encuentra en las CP de los hongos *Gibberella zeae* y varios *Aspergilli* y también en algunas proteobacterias como *Xanthomonas*, *Pseudomonas* y *Xylella* (Peraza L y Hansberg W, datos no publicados).

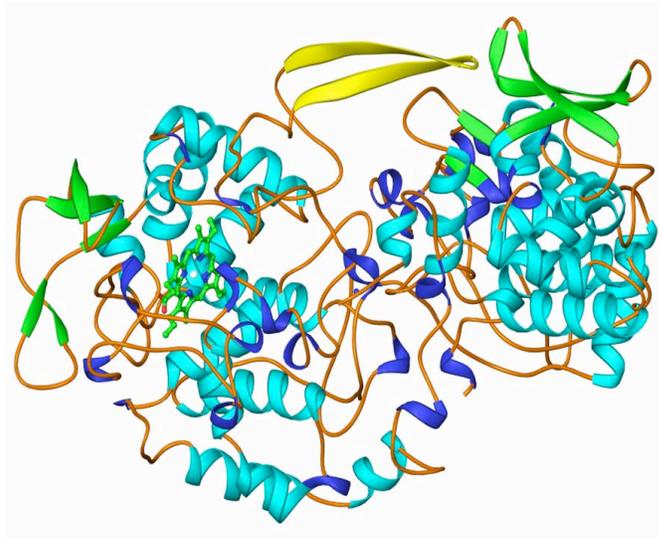


Figura 8. Modelo de la estructura tridimensional de la CAT-2
Representación en listones de la estructura secundaria del monómero de la CAT-2 (verde, láminas β ; azul claro, hélices α y azul oscuro, hélices 3_{10}). Extensión del asa LL1 (amarillo). El grupo hemo se muestra representado en bastones y esferas (verde). (Peraza, 2005)

La forma funcional de la enzima es un homodímero cuyo peso molecular es de aproximadamente 165 kDa. El peso molecular de cada subunidad es de 83.4 kDa, más el grupo hemo. El valor de $R_z (A_{460/480})$ de la CAT-2 es bajo (0.46), lo que posiblemente indica que no toda la enzima tiene hemo y tal vez lo pierde con facilidad. La mayor parte del hemo está oxidado (Peraza, 2005). La enzima se modifica con el oxígeno en singulete de manera semejante a la CAT-1 en la que se ha demostrado que dicha oxidación ocurre en el grupo hemo (Lledias *et al.*, 1998).

La CAT-2 es una enzima citosólica. Pese a que la enzima se induce con compuestos que se metabolizan en los peroxisomas, ésta no se encuentra en los organelos como los peroxisomas o en los glioxisomas y tampoco tiene las secuencias típicas para su localización peroxisomal (Peraza, 2005).

La CAT-2 tiene actividad de catalasa y de peroxidasa. Puede reducir el peróxido de hidrógeno y otros peróxidos orgánicos como el ter-butilhidroperóxido usando como agente reductor la o-dianisidina, el guaiacol, la diaminobencidina, el ácido 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazlina-6-sulfónico) (ABTS) y el ascorbato.

Durante el crecimiento del hongo en medio mínimo, la actividad de la CAT-2 aparece en la etapa de crecimiento pre-estacionario (24 h), a partir de la cual aumenta y se mantiene en un nivel relativamente constante, hasta la etapa tardía del crecimiento estacionario. Durante el desarrollo asexual del hongo, la enzima se induce en las diferentes estructuras que forman parte del proceso de conidiación en el micelio adherido, el micelio aéreo y especialmente en los conidios. La acumulación del transcrito y la actividad de la enzima se inducen cuando el hongo crece en condiciones de choque térmico o cuando metaboliza sustratos que representan una fuente pobre de carbono como el metanol, el acetato o el urato (Peraza, 2005). Esta inducción se puede observar tanto en cultivos sólidos como en cultivos líquidos. Se ha propuesto que la enzima se puede regular principalmente a nivel transcripcional durante el crecimiento o a nivel pos-transcripcional durante el proceso de conidiación. Se ha encontrado además que la enzima está asociada con los procesos de autofagia y autólisis del hongo (Peraza, 2005).

Se ha visto que el proceso de conidiación en cultivos sumergidos se induce en condiciones de privación de carbono o de nitrógeno (Muller, 1989). Sin embargo, el proceso de conidiación sumergida se ha estudiado poco y no se conocen los elementos que la regulan ni los que la diferencian de los otros procesos de conidiación. Se ha encontrado que la formación de estas esporas al igual que la conidiación aérea, depende de los genes *acon 2*, *acon 3* y *fl*. Al evaluar el proceso de conidiación en cultivos líquidos de una cepa carente de la CAT-2 (*cat-2^{RIP}*) se encontró que la ausencia de la enzima resulta en una mayor formación de conidios durante la etapa tardía del crecimiento estacionario (4-5 días). La cantidad de conidios producidos es al menos del doble en la cepa sin *cat-2* que en la cepa silvestre o en otras cepas mutantes en genes antioxidantes, como en una cepa sin el gen *cat-3* o sin el gen *sod-1*. Esta diferencia en el número de conidios formados entre la cepa silvestre y la *cat2^{RIP}* se hace aún más evidente al utilizar como fuente de carbono el ácido oléico en presencia de bajas concentración de sacarosa (Peraza, 2005).

Por los resultados anteriores pensamos que la CAT-2 es importante para la diferenciación celular del hongo y en particular para el proceso de conidiación sumergida. Estamos interesados en estudiar la enzima con mayor detalle el mecanismo catalítico de la enzima y en conocer la relación entre esta enzima y la conidiación sumergida.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Sobre-expresar la catalasa/peroxidasa de *Neurospora crassa* en *Escherichia coli* como una herramienta que nos permita obtener la enzima purificada de una manera rápida y eficiente para posteriormente estudiar con detenimiento el mecanismo catalítico de la enzima y determinar su estructura.

Objetivos particulares

- 1) Construir un vector de expresión que codifique para el gen *cat-2*.
- 2) Expresar en *E. coli* la CAT-2 de *N. crassa* utilizando el plásmido que codifica para el gen *cat-2*.
- 3) Optimizar la expresión de la CAT-2 variando el tiempo de inducción y la concentración de compuestos requeridos para la biosíntesis del hemo: ácido δ -amino levulínico y de citrato férrico.
- 4) Purificar la enzima expresada en *E. coli*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y plásmidos utilizados

- Plásmidos

Los plásmidos pCP5 y pCP7 fueron construidos por el Dr. C. Leonardo Peraza Reyes. Los plásmidos pQC2-3D y pW90A se generaron en este trabajo.

- Cepas de *E. coli*

Se usó la cepa JM109 para almacenar y mantener los plásmidos pQC2-3D y pW90A, ya que produce suficiente represor *lac* para bloquear la transcripción del gen de interés, aunque puede usarse para expresar la proteína es menos eficiente.

La cepa M15[pREP4] de QIAGEN (No.Cat.34210.) tiene el fenotipo Nal^s, Str^s, Rif^s, Thi⁻, Lac⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺ y contiene el plásmido pREP4, que confiere resistencia a la kanamicina. Esta cepa expresa constitutivamente la proteína represora *lac* (codificada por el gen *lacI*) la cual se une a la secuencia operadora e inhibe la expresión del gen. Cuando se agrega el isopropyl-β-D-tiogalactosido, éste inhibe a la proteína represora *lac* y permite así que la polimerasa del ARN del fago T5 transcriba la secuencia del gen de interés.

Condiciones de crecimiento de *Escherichia coli*

Se inoculó *E. coli* en cajas de Petri con medio sólido Luria-Bertani (LB) (GibcoBRL) al 2% y agar al 2%, suplementado con ampicilina (100 µg/ml). Se incubó a 37°C durante una noche.

Para el crecimiento de *E. coli* en medio líquido se usó LB al 2% suplementado con los antibióticos ampicilina (100µg/ml) y kanamicina (25 µg/ml). El cultivo de *E. coli* se incubó a 37°C con agitación a 200 rpm.

Durante la transformación de las células competentes, se utilizó el medio SOB el cual contiene 0.5% de extracto de levadura (BIOXON), 2% de peptona de caseína (BIOXON), NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM y MgSO₄ 10 mM.

Almacenamiento de las cepas de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* que contienen los plásmidos construidos en este trabajo se guardaron en glicerol. Para ello se agregaron 150 µl de glicerol a un volumen de 850 µl de células. Las células en glicerol se almacenaron a -70°C.

Extracción del plásmido de *E. coli*

La extracción del plásmido se llevó a cabo usando el estuche Plasmid Mini Kit (QIAGEN). Se inoculó 3 ml de medio LB líquido, suplementado con ampicilina, con una colonia aislada de *E. coli*, crecida en placa durante una noche. El cultivo se incubó a 37°C durante 14-16 horas con agitación. Posteriormente, las células se recuperaron en una microfuga centrifugando a 13,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. A la pastilla de células se le agregó 200 µl del amortiguador P1 (Tris-Cl 50 mM pH 8.0; EDTA 10 mM, ARNasa A 100 µg/ml) del estuche y las células se resuspendieron utilizando un Vortex. Para lisar las células se agregó a la suspensión 200 µl del amortiguador P2 (NaOH 20 mM; SDS 1%) y se mezcló invirtiendo el tubo 6 veces pero sin agitar y se incubó la suspensión a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 200 µl del amortiguador P3 (acetato de potasio 3 M, pH 5.5), se mezcló de la misma manera y se incubó a 4°C durante 5 minutos. Luego se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recuperaron 400 µl del sobrenadante. Del sobrenadante se precipitó el ADN agregando 800 µl de etanol absoluto. El ADN se recuperó centrifugando durante un minuto a 13,000 rpm a temperatura ambiente. La pastilla de ADN se lavó resuspendiéndola en 500 µl de etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente y la pastilla obtenida se dejó secar durante 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente, se resuspendió el ADN en 30 µl de agua estéril. El ADN se almacenó a -20°C.

Transformación de una cepa de *E. coli*

A un vial con 250µl de células de *E. coli* en hielo se les agregó 500 ng del plásmido. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C y posteriormente se les dio un choque térmico a 42°C por 2 minutos. Se incubaron nuevamente en hielo durante tres minutos y a continuación se les agregó 800 µl del medio SOB y se incubaron a 37°C con agitación durante una hora. Las células se concentraron centrifugando un minuto a 13,000 rpm. Por último, se plaquearon en medio LB suplementado con ampicilina y se incubaron a 37°C durante una noche.

Amplificación del gen *cat-2*

Se amplificó el gen estructural de *cat-2* (Figura 9) empleando la PCR. Se utilizó la enzima polimerasa de ADN Elongase-mix de Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA) y el cebador cat2-50,

que contiene un sitio de corte para la enzima *SacI* (5' GACCGAGCTCTCCGAGTGC 3'), y el *cat2-30*, que contiene un sitio de corte para la enzima *PstI* (5' GATCCTGCAGCTAAAGCTTGG 3'). Como molde se utilizaron 200 ng del plásmido pCP5 (que contiene al gen *cat-2*, ver apéndice) con una concentración de 2 mM de cloruro de magnesio. El programa que se utilizó para la amplificación consistió en:

1. Desnaturalización inicial: 94°C por 3 minutos, 1 ciclo
2. 30 ciclos de amplificación, cada uno compuesto por:
 - desnaturalización: 94°C por 30 segundos
 - alineación: 54°C por 45 segundos
 - extensión: 68°C por 3 minutos
3. Extensión final: 68°C por 10 minutos

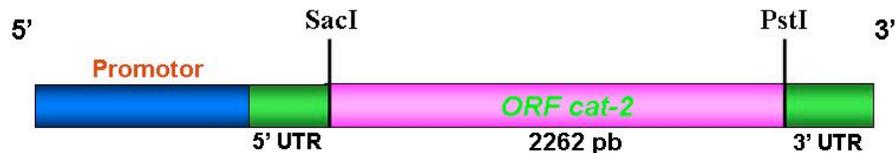


Figura 9. Esquema de la región amplificada del gen *cat-2*

Construcción del plásmido pQC2-3

El producto de la PCR se analizó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Se cortó la banda de peso molecular esperado. El ADN se purificó utilizando el estuche QIAquick Gel Extraction (No. Cat. 28704 QIAGEN GmbH, Alemania) de acuerdo con el procedimiento indicado por el fabricante. Enseguida se cortó con las endonucleasas de restricción *PstI* y *SacI*. A continuación se preparó una reacción de ligación para clonar el fragmento de ADN en el vector de expresión pQE30 (ver el anexo). Para la reacción de ligación se utilizaron: 400 ng del plásmido pQE30 digerido con las enzimas *PstI* y *SacI*, 800 ng del fragmento obtenido de la PCR, 1 µl de amortiguador de ligasa 5 x y 1 µl de la enzima ADN ligasa (Gibco BRL). La reacción de ligación se incubó una noche a 16°C.

El producto de la reacción de ligación se usó para transformar la cepa JM109 de *E. coli*. Se seleccionaron las colonias transformadas que mostraron resistencia a la ampicilina y se

analizaron posteriormente con diversas endonucleasas de restricción.

Análisis del inserto con endonucleasas de restricción

Para verificar la incorporación del plásmido en las cepas transformadas que mostraron resistencia a la ampicilina, se extrajo el plásmido de cada cepa y se realizó una digestión doble con las enzimas *Pst*I y *Sac*I que cortan el vector en el sitio de clonación. Posteriormente se realizó una digestión con la enzima *Nco*I para la cual hay dos sitios de corte, uno dentro del vector y otro dentro del inserto. Se realizó una tercera digestión utilizando la enzima *Eco*RV que tiene un único sitio de corte ubicado en el inserto.

Corrección de la mutación introducida por la reacción en cadena de la polimerasa del ADN

La secuenciación del gen clonado mostró que se había introducido con la PCR una mutación que cambia la prolina 319 por una serina. Para corregir la mutación el plásmido pQC2-3 se digirió con la enzima *Bg*III. Así se aisló un fragmento de 777 pb que contenía la mutación, dicho fragmento mutado en pQC2-3 se reemplazó por un fragmento sin la mutación. El fragmento de 777pb sin la mutación se obtuvo al digerir el plásmido pCP5 (ver el anexo) con la enzima *Bg*III. Las digestiones se analizaron mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se purificaron los fragmentos mencionados usando el estuche QIAquick (QIAGEN). Los fragmentos se ligaron utilizando la ADN Ligasa (New England Biolabs). El plásmido resultante se nombró pQC2-3D (ver apéndice1). Este nuevo plásmido se secuenció para verificar la corrección de la mutación.

Sobre-expresión de la CAT-2 en *E. coli*

Se utilizó el plásmido pQC2-3D para transformar la cepa de *E. coli* M15/pREP4. Después de la transformación las células se hicieron crecer en un cultivo de 10 ml de medio LB líquido suplementado con ampicilina y kanamicina durante una noche a 37° C. Al día siguiente se tomaron 2.5 ml del cultivo y se sembraron en 50 ml de medio LB líquido suplementados con dichos antibióticos. El cultivo se incubó a 37°C con agitación de 300 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) de 0.5 (aproximadamente 2-3 horas). Al cabo de lo cual se adicionó 1 mM del inductor IPTG (Gibco, BRL) y la inducción se mantuvo a lo largo de 4

horas. Después, se centrifugó el cultivo a 7,000 rpm durante 40 minutos a 4° C y la pastilla de células se resuspendió en 5 ml de amortiguador de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8.0). Posteriormente, se lisaron las células con 1 mg/ml de lisozima (SIGMA), incubándolas en hielo durante 30 minutos, seguidos de 3 ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a 42°C. Una vez lisadas, las células se centrifugaron a 13,000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se aisló el sobrenadante, que corresponde al extracto soluble, y también la pastilla, que corresponde al extracto insoluble, la cual se resuspendió en 5 ml de amortiguador de lisis. Ambos extractos se guardaron a 4°C hasta su utilización.

Mayor expresión de la CAT-2 en presencia de ácido δ-amino levulínico y de citrato férrico

Se incubó a 37 °C la cepa de *E. coli* transformada con el plásmido pQC2-3D en 5 ml de medio LB, suplementado con antibióticos en matraces Erlenmeyer de 25 ml. Cuando los cultivos alcanzaron una OD₆₀₀ de 0.5 se indujeron con 1 mM de IPTG se agregó 0.1 mM de citrato férrico y distintas concentraciones de ácido δ-aminolevulínico (ALA, por sus siglas en inglés) (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mM). La inducción en presencia de fierro y de ALA se mantuvo durante 5 horas. Posteriormente se obtuvo la proteína de estos cultivos y se analizó la actividad de la CAT-2 mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés) en condiciones no desnaturizantes. El gel se reveló la actividad de catalasa (ver protocolo en la página 29).

Por otro lado, a otros cultivos se les agregó una concentración fija de ácido δ-aminolevulínico (1 mM) y se varió la concentración de citrato férrico. La inducción en presencia de fierro y ALA se mantuvo durante 5 horas. Posteriormente se obtuvieron extractos totales de proteína de estos cultivos y se analizó la actividad de la CAT-2 mediante PAGE en condiciones no desnaturizantes que se revelaron por actividad de catalasa.

Purificación mediante una cromatografía de afinidad al níquel de la CAT-2 expresada

El plásmido usado para expresar la CAT-2 nos permitió fusionar una etiqueta de 6 histidinas a la proteína a en su extremo N-terminal. Para poder incluir esta etiqueta a la enzima se quitó el ATG inicial de la proteína. Dicha etiqueta facilita la purificación de la proteína porque ésta se puede con gran afinidad a una resina que tiene unidos metales como el níquel gracias a los

anillos de imidazol que forman parte de la estructura de las histidinas. Para la purificación de la CAT-2 primero se obtuvo un lisado de células de un cultivo de 50 ml inducido con 1 mM de IPTG. Para disminuir la viscosidad del lisado se agregó ARNasa (10 µg/ml) y ADNasa (5 µg/ml) y se incubó 15 minutos en hielo. Después de centrifugar a 10,000 x g durante 20 minutos a 4°C se pasó 4 ml del sobrenadante a un tubo, se agregó 1 ml de resina Ni-NTA (No. Cat. 30230, QIAGEN) y se mezcló con agitación de 200 rpm durante 1 hr a 4°C. Después de este periodo la resina se cargó en una columna cerrada de 150 x 8 mm. Se destapó la columna y se colectó el fluido en un tubo, el cual se almacenó a 4°C. A continuación se pasaron 4 ml de amortiguador para lavado (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8.0) que se colectaron en un tubo y un segundo lavado con 4 ml de amortiguador para lavado se colectó en otro tubo. Ambas fracciones se guardaron a 4°C. Posteriormente se desprendió la proteína de la columna agregando cuatro veces 0.5 ml de amortiguador (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 8.0). Las fracciones obtenidas se colectaron en cuatro tubos y se guardaron a 4°C. Las fracciones de la purificación se analizaron mediante un PAGE con SDS.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para verificar la expresión de la CAT-2 en los extractos de proteína obtenidos de *E. coli*, éstos se analizaron por PAGE con poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970). El gel se preparó de la siguiente manera:

	Gel Separador	Gel Concentrador
agua destilada	1.888 ml	1.1 ml
Tris-HCl 2M pH 8.8	1.083 ml	pH(6.8) 283.5 µl
Bis-acrilamida al 30%(BIO-RAD)	2.027 ml	283.5 µl
SDS 10%	50 µl	16.6 µl
persulfato de amonio al 10%	12 µl	8.3 µl
TEMED (SIGMA)	8.3 µl	3.3 µl

Las muestras se resuspendieron en 10 µl de amortiguador de carga 2 x (20% glicerol, 0.125 M Tris/HCl pH 6.8, 4% SDS, 0.02% azul de bromofenol, 10% mercaptoetanol). Para realizar la electroforesis se empleó una cámara Mini-proteanII (BIO-RAD). La electroforesis

se realizó con el amortiguador de corrida (1.44% glicina, 0.3% Trizma base, 0.1% SDS) durante 1 hora y 10 minutos a 200 V. Al finalizar la corrida, el gel se tiñó con una solución Coomassie (240 mg de azul de Coomassie, 120 ml metanol, 40 ml CH₃COOH, agua cbp 500 ml).

Para comprobar la funcionalidad de la proteína expresada, las muestras se analizaron mediante PAGE con poliacrilamida al 8% en condiciones no desnaturizantes y se reveló en el gel la actividad de catalasa y de peroxidasa. El gel se preparó de la siguiente manera:

	Gel separador	Gel concentrador
agua destilada	2.583 ml	1.1 ml
Tris-HCl 2M pH 8.8	1.083 ml	283.5 µl
Bis-acrilamida al 30%(BIO-RAD)	1.333 ml	283.5 µl
persulfato de amonio al 10%	16.6 µl	8.3 µl
TEMED (SIGMA)	8.3 µl	3.3 µl

A las muestras se les agregó 10 µl de amortiguador de carga 2 x (10% glicerol, 5% Tris/HCl, pH 6.8; 0.02% azul de bromofenol). Para realizar la electroforesis se empleó una cámara Mini-proteanII (BIO-RAD). La electroforesis se realizó en amortiguador de corrida (glicina 1.44%, Trizma base 0.3%) durante 2 horas 30 minutos a 150 V.

El revelado del gel por actividad de catalasa se realizó empleando el método que se describe a continuación. Para fijar el gel, éste se sumergió en una solución de metanol al 5% durante dos minutos y posteriormente se enjuagó dos veces con agua. Después, se incubó el gel durante 5 minutos en 35 ml de una solución de peróxido de hidrógeno 10 mM. Pasado este tiempo se enjuagó una vez con agua y se agregaron 15 ml de una solución de ferrocianuro de potasio al 2% y 15 ml de una solución de cloruro férrico al 2%. El gel se dejó sumergido en estas soluciones hasta que se detectaron las bandas de actividad. Finalmente se sumergió el gel en una solución de ácido acético al 10% para detener la reacción.

Para revelar la actividad de peroxidasa en el gel, se empleó una solución que contiene amortiguador de acetato de sodio 50 mM, pH 6.5; H₂O₂ 10 mM y o-dianisidina 0.1 mM como

agente reductor. El gel se incubó en 30 ml de la solución hasta que se detectaron las bandas de actividad y se enjuagó con agua.

Cuantificación de la proteína total en los extractos celulares

Para la cuantificación de la proteína total en los extractos celulares se utilizó el reactivo Bradford (BIO-RAD, No. Cat 500-0006). En un tubo se colocaron 2 μ l de la muestra problema y se le agregó 798 μ l de agua destilada y 200 μ l de reactivo Bradford. Se midió la absorbencia a 595 nm en un espectrofotómetro Beckman (DU 650). La medición se llevó a cabo inmediatamente después de agregar el reactivo Bradford. Como referencia, se calibró el espectrofotómetro con un tubo que sólo contenía reactivo Bradford y agua. Para calcular la concentración de proteína de las muestras problemas se consideró que una absorbencia de 0.07 equivale a 1mg/ml de proteína.

IV. RESULTADOS

Inserción de *cat-2* en el vector de expresión y su verificación

Para sobre-expresarse la CAT-2 en *E. coli* se construyó un vector de expresión que contiene el marco de lectura abierta del gen *cat-2*. Para la construcción del vector de expresión se amplificó el gen *cat-2* desde 3 pb río abajo del codón de inicio hasta el codón de término. Se utilizó como molde el ADN del plásmido pCP-5 (ver el anexo) y se usó la DNA polimerasa Elongase mix (Invitrogen) y los cebadores *cat2-5O* y *cat2-3O*. El producto de 2262 pb se muestra en la Figura 10.

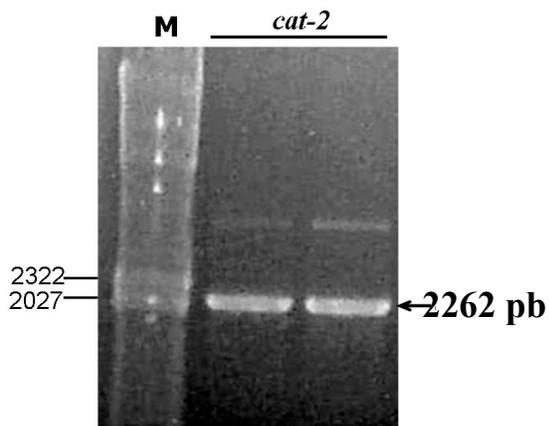


Figura 10. Producto de la amplificación del gen *cat-2*

El producto de la amplificación del ORF del gen *cat-2* tiene el peso esperado de 2262 pb. **M** indica el marcador de peso molecular λ DNA Hind III.

El producto obtenido con la PCR se clonó en el vector de expresión pQE30 (ver el anexo) usando los sitios de restricción para *SacI* y *PstI*, que se localizan en el sitio de clonación del vector. El vector pQE30, lleva el promotor inducible de la polimerasa de RNA del fago T5 y un sitio de unión al ribosoma lo cual asegura altos niveles de transcripción y de traducción del gen insertado y del gen β -lactamasa (*bla*), que confiere resistencia a la ampicilina. Con el gen clonado en el vector se transformó la cepa JM109 de *E. coli* y se seleccionaron tres colonias que son resistentes a la ampicilina. Estas colonias se denominaron pQC2-1, pQC2-2 y pQC2-3.

Para verificar la clonación del gen *cat-2* en las tres colonias seleccionadas, se aisló el ADN plásmidico y se digirió con *Sac I* y *PstI* simultáneamente, que fueron las enzimas usadas para clonar el inserto de *cat-2* en el vector pQE30. Con esta doble digestión se obtuvieron dos fragmentos, uno de 2262 pb, que corresponde al tamaño del inserto *cat-2* y otra de 3461 pb, que corresponde al vector (Figura 11B). Además se realizó otra digestión utilizando los sitios de restricción para la enzima *NcoI* que se localizan uno dentro del vector y otro dentro del inserto. De esta digestión se generaron dos fragmentos: uno de 3,258 pb y otro de 2,465 pb (Figura 11A). Dos de los tres plásmidos analizados (el pQC2-1 y el pQC2-3), tuvieron el patrón de restricción esperado con ambas digestiones (Figura 11-C). El plásmido pQC2-2 no tuvo el patrón esperado y solo se observó una banda mayor a 3 kb, lo que indica que probablemente sea el vector ligado sin el inserto.

Sobre-expresión de la CAT-2 en *E. coli*

Para probar si las construcciones para sobre-expresar la CAT-2 funcionaban, se realizó un primer ensayo de expresión. Se transformó la cepa M15/pREP4 de *E. coli* con los plásmidos pQC2-1 y pQC2-3. Cultivos de 50 ml de las cepas transformadas con estos plásmidos se indujeron con 1 mM de IPTG durante 4 horas a 37°C. Se aislaron las células y se lisaron con lisozima, y luego con tres ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a 42°C. El extracto celular se centrifugó y se recuperó el sobrenadante.

Para verificar la sobre-expresión de la CAT-2 se analizaron los extractos de proteína totales por PAGE en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Como se muestra en la Figura 12, con ambos plásmidos, se observa una banda de 83 kDa en los cultivos inducidos que corresponde al peso de la CAT-2. Se observa también que la expresión de la proteína es mejor cuando se usa el plásmido pQC2-3.

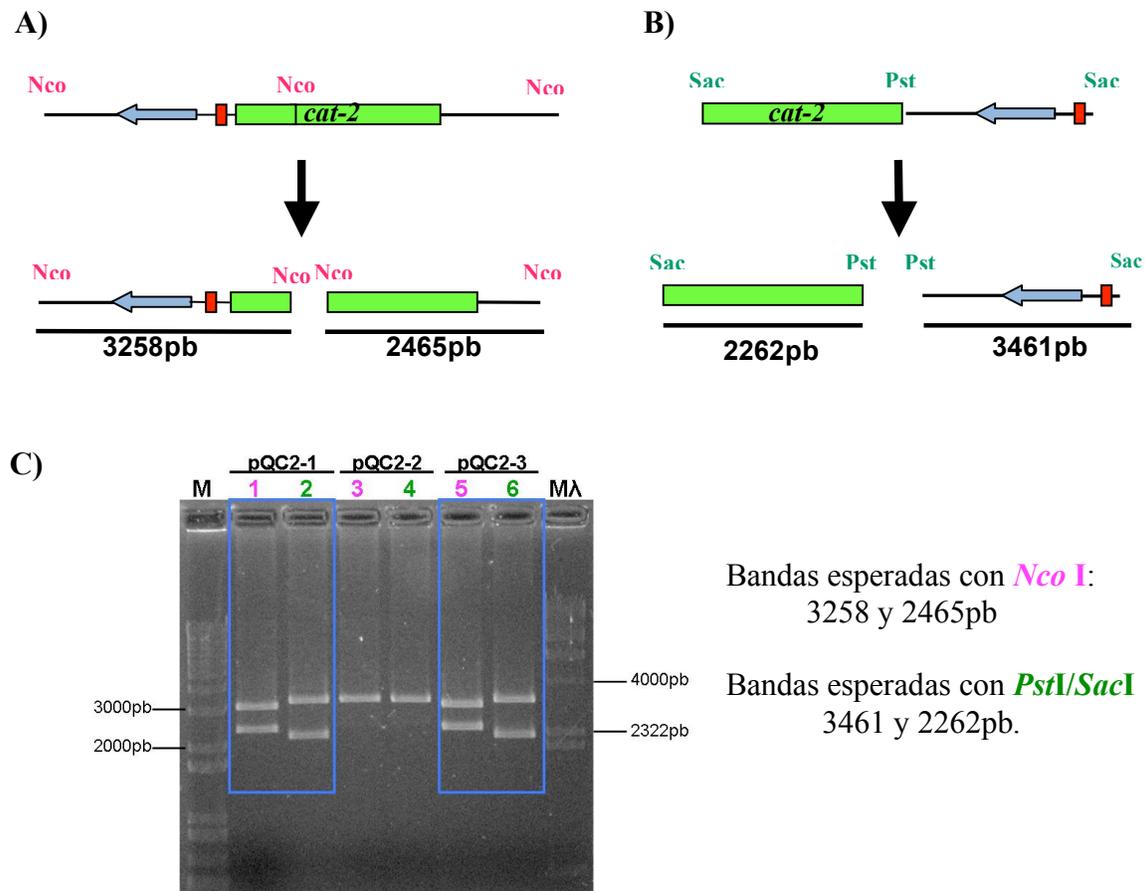


Figura 11. Patrón de restricción de los plásmidos pQC2-1, pQC2-2 y pQC2-3

A) Esquema del análisis de restricción con la enzima *Nco*I. B) Esquema de la digestión doble con las enzimas *Pst*I y *Sac*I. C) El ADN plasmídico de 3 colonias de *E. coli* que son resistentes a la ampicilina se cortó con las endonucleasas de restricción *Pst*I y *Sac*I (Carriles 1, 3 y 5) o con la enzima *Nco*I (Carriles 2, 4 y 6). Los plásmidos pQC2-1 y pQC2-3 mostraron el patrón de corte esperado con ambas digestiones. M indica el marcador de peso molecular 1 kb Plus y Mλ indica el marcador de peso molecular DNAλ *Hind* III.

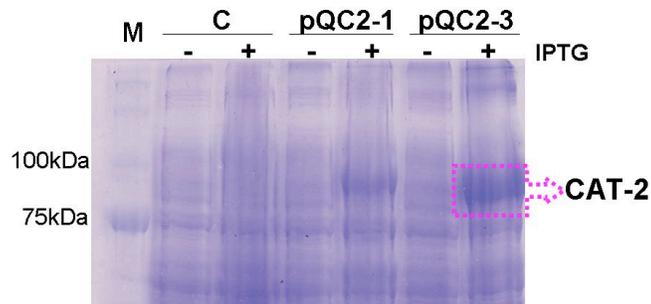


Figura 12. La CAT-2 expresada en *E. coli* tiene el peso esperado (83 kDa)

SDS-PAGE en un gel de 12% de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. Carriles: M, marcador de peso molecular; C, vector sin *cat-2* como control de expresión; (-) cultivos sin inducir; (+) cultivos inducidos.

Para verificar si la proteína expresada se encuentra en la fracción soluble o si va a los cuerpos de inclusión, analizamos por PAGE el extracto celular soluble y el insoluble. Se encontró que la proteína expresada está en el extracto soluble (Figura 13). Además, se observó nuevamente que la expresión de la CAT-2 es mejor con el plásmido pQC2-3. Por eso se decidió emplear este plásmido para el resto de los experimentos.

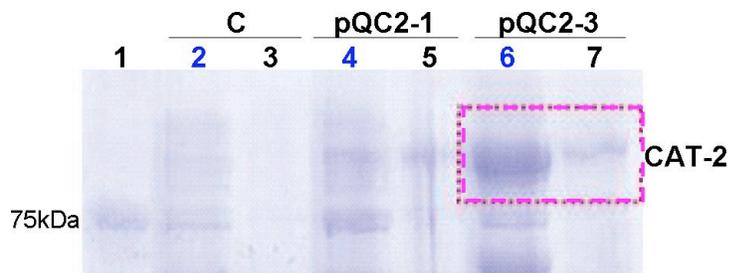


Figura 13. La CAT-2 expresada en *E. coli* está en la fracción soluble

Análisis del extracto total de proteína con SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. Carriles: **1**, marcador de peso molecular; **2, 3**, vector vacío; **4, 5**, pQC2-1; **6, 7**, pQC2-3; **2, 4, 6**, fracción soluble; **3, 5, 7**, fracción insoluble.

Al analizar la expresión de la CAT-2 a lo largo de seis horas de inducción, se observó que conforme se aumenta el tiempo de inducción la expresión de la CAT-2 aumenta, encontrando el óptimo a las 6 horas (Figura 14).

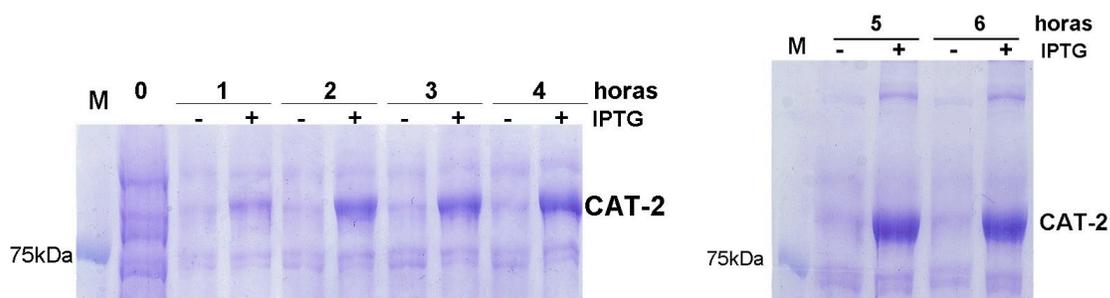


Figura 14. La expresión de la CAT-2 mejora al aumentar el tiempo de inducción

Se obtuvo un extracto de proteína total a partir de un cultivo de 50 ml de *E. coli* transformada con pQC2-3, inducido con 1 mM IPTG a 37°C. (-) cultivo sin inducir; (+) cultivo inducido; (M) marcador de peso molecular.

El gen *cat-2* clonado en el plásmido pQC2-3 se secuenció por el método de Sanger y se encontró que tenía una mutación que se introdujo con la PCR. Para corregir la mutación se reemplazó el fragmento mutado en pQC2-3 por un fragmento sin la mutación (ver materiales y métodos). El plásmido resultante se nombró pQC2-3D (ver el anexo). El gen se volvió a secuenciar para verificar la corrección de la mutación.

Asimismo se verificó que pQC2-3D también sobre-expresa la CAT-2. Como se muestra en la Figura 15 con el pQC2-3D se obtiene una banda de 83 kDa que corresponde al peso de la CAT-2.

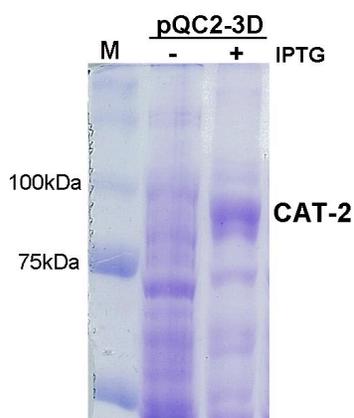


Figura 15. Expresión de la CAT-2 con el plásmido pQC2-3D

Se obtuvo un extracto de proteína total proveniente de un cultivo de 10 ml de *E. coli* transformada con pQC2-3D e inducido con 1 mM de IPTG durante 6 horas. Carriles: M, marcador de peso molecular; (-) cultivo sin inducir; (+) cultivo inducido.

Para verificar que la CAT-2 expresada es activa, se analizaron los extractos de proteína totales con PAGE en condiciones no desnaturizantes y se reveló en los geles la actividad de catalasa y de peroxidasa. La proteína expresada tiene actividad de catalasa (Figura 16A) y también de peroxidasa (Figura 16B).

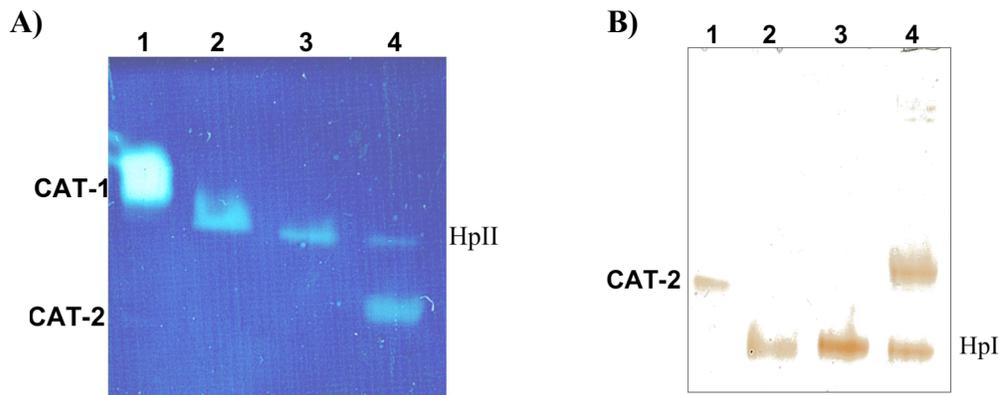


Figura 16. La CAT-2 expresada con el pQC2-3D tiene actividad de catalasa y de peroxidasa Se obtuvo un extracto de proteína total proveniente de un cultivo de 10 ml de *E. coli*, transformada con el pQC2-3D, inducido con 1 mM de IPTG durante 6 horas. **A)** Actividad de catalasa. Carriles: **1**, extracto de *Neurospora*; **2**, vector vacío inducido; **3**, pQC2-3D sin inducir; **4**, pQC2-3D inducido. **B)** Actividad de peroxidasa. Carriles: **1**, extracto de *Neurospora*; **2**, vector vacío inducido; **3**, pQC2-3D sin inducir; **4**, pQC2-3D inducido. **HpI** y **HpII** son la catalasa/peroxidasa y la catalasa de *E. coli*, respectivamente. **CAT-1**, es la catalasa monofuncional de *N. crassa*

Mayor expresión de la CAT-2 en presencia de ácido δ -aminolevulínico y de citrato férrico

La CAT-2 es una hemo-proteína y una de las dificultades para expresar este tipo de proteínas en *E. coli* es la incorporación del grupo prostético hemo, que se requiere para la actividad de la enzima. En el sistema de sobre-expresión utilizado, la velocidad de síntesis de la proteína es generalmente mayor que la del hemo, dando como consecuencia la producción de enzima sin hemo e inactiva.

El paso limitante para esta biosíntesis del hemo es la producción del ácido δ -aminolevulínico. Para suplir esta deficiencia se añadió ALA a los cultivos durante la inducción. En la Figura 17 se muestra que la actividad de la CAT-2 expresada mejora si la inducción se lleva a cabo en presencia de ALA y de citrato férrico. Se muestra también, que la actividad es mayor al incrementar la concentración de ALA.

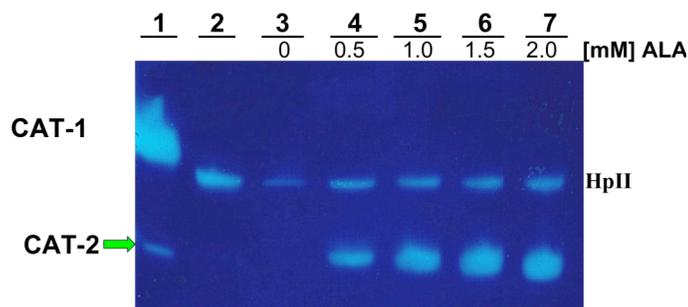


Figura 17. Actividad de catalasa de la CAT-2 expresada en presencia de citrato férrico y de diferentes concentraciones de ALA

Se obtuvieron extractos celulares a partir de cultivos inducidos con 1 mM de IPTG durante 5 horas con 0.1 mM citrato férrico y una concentración variable de ALA. Carriles: **1** extracto de *N. crassa*; **2**, cultivo sin inducir; **3, 4, 5, 6** y **7** cultivos inducidos con la cantidad de ALA indicada en la imagen. **HpII**, catalasa de *E. coli*. **CAT-1**, catalasa monofuncional de *N. crassa*

Como otro de los elementos necesarios es el fierro, se varió también la concentración de fierro en el medio durante la inducción en presencia de una concentración de ALA constante. En la Figura 18 se observa nuevamente que la adición de citrato férrico y de ALA mejora la actividad de la CAT-2 expresada en *E. coli*. El monómero es más activo y se puede observar incluso una banda que puede corresponder al dímero activo de la CAT-2. En el control sin inducir, en presencia de fierro y de ALA sólo se observa la actividad de la catalasa/peroxidasa HpI y de catalasa HpII de *E. coli*.

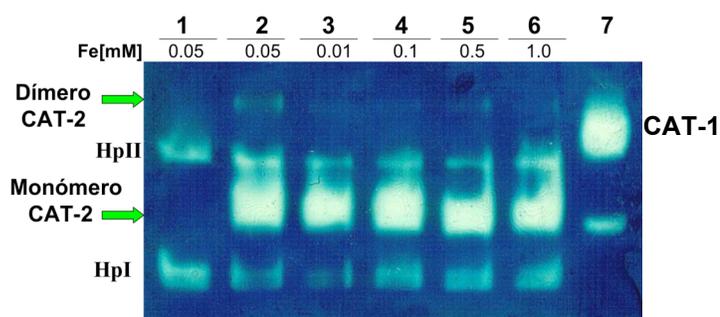


Figura 18. Actividad de catalasa de la CAT-2 expresada en presencia de ALA y de diferentes concentraciones de citrato férrico

Se obtuvieron extractos de proteína a partir de 10 ml de cultivos inducidos con 1 mM de IPTG durante 5 horas en presencia de 1 mM de ALA y una concentración variable de citrato férrico como se indica en la figura. Carriles: **1** cultivo con ALA y fierro, pero sin inducir; **2, 3, 4, 5, 6**, cultivos inducidos; **7** extracto de *N. crassa*. **HpI**, catalasa/peroxidasa y **HpII** catalasa de *E. coli*. **CAT-1**, catalasa monofuncional de *N. crassa*.

Purificación mediante una cromatografía de afinidad al níquel de la CAT-2 expresada

Para verificar que la CAT-2 tiene unida la etiqueta de seis histidinas en el extremo N-terminal, se purificó la CAT-2 por su unión a una matriz de Ni-NTA. La purificación se realizó a partir de un extracto celular proveniente de un cultivo de 50 ml inducido con 1 mM de IPTG durante 6 horas. La lisis se realizó en presencia de sales, iones y de una baja concentración de imidazol (10 mM) para prevenir las interacciones no específicas con la matriz de Ni-NTA. Para disminuir la viscosidad el extracto celular se trató con RNAsa y con DNAsa. Posteriormente el extracto de proteína se incubó con la resina de Ni-NTA y se colocó la mezcla en una columna de 150 x 8 mm. Se realizaron lavados en presencia de imidazol a una concentración de 20 mM. Finalmente la proteína se desprendió con una concentración de imidazol de 250 mM.

En la Figura 19 se muestra el análisis con SDS-PAGE de cada uno de los pasos de la purificación. En el primer paso se observan las proteínas que no tienen afinidad por la columna. La CAT-2 purificada se encuentra en las fracciones que corresponden al desprendimiento de las proteínas con 250 mM de imidazol. Se observa una banda de 83 kDa del monómero de CAT-2 y una banda de 165 kDa que podría corresponder con el dímero de CAT-2.

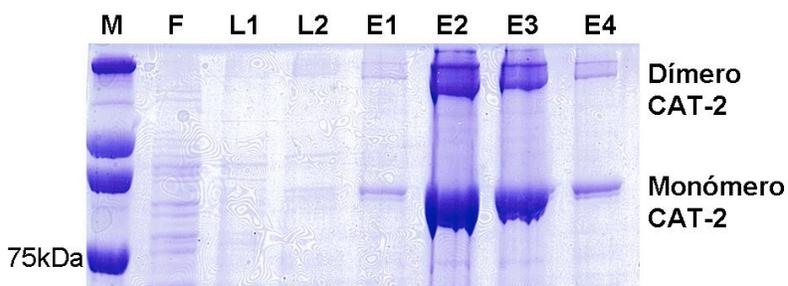


Figura 19. La CAT-2 expresada se purifica con una cromatografía de afinidad al níquel

La CAT-2 expresada tiene una etiqueta de seis histidinas. El extracto celular proviene de un cultivo de 50 ml de *E. coli*, transformada con el pQC2-3D, inducido con 1 mM de IPTG. Se agregaron 4 ml de extracto celular y 1 ml de resina Ni-NTA en una columna de 150 x 8 mm. El análisis se realizó mediante SDS-PAGE y el gel se tiñó con azul de Coomassie. Carriles: **M**, marcador de peso molecular; **F**, primera fracción; **L1**, primer lavado; **L2**, segundo lavado; **E1**, primer desprendimiento; **E2**, segundo desprendimiento; **E3**, tercer desprendimiento; **E4**, cuarto desprendimiento.

V. DISCUSIÓN

El estudio detallado de las catalasa/peroxidasas ha sido posible gracias a los avances en las técnicas de la biología molecular y del ADN recombinante. En particular, la sobre-expresión de proteínas heterólogas en organismos de crecimiento rápido, como *E. coli*, ha permitido la obtención de grandes cantidades de proteína de manera rápida y poco costosa. Así, por ejemplo, la expresión de la CP de *Synechocystis* en *E. coli* ha permitido la purificación de la enzima en cantidad suficiente para determinar su estructura, y además, la expresión de proteínas mutantes ha ayudado a elucidar el mecanismo catalítico de la enzima (Jakopitsch *et al.*, 1999).

En el presente trabajo hemos logrado expresar el gen *cat-2* en *E. coli*. La CAT-2 expresada se encontró en el extracto soluble, lo que permite recuperar la enzima en su condición nativa y activa y obtenerla en cantidad suficiente para llevar a cabo estudios bioquímicos y estructurales.

La CAT-2 expresada en *E. coli* está fusionada a una etiqueta de 6-histidinas en el extremo N-terminal que facilitan su purificación. Para poder incluir esta etiqueta a la enzima se quitó el ATG inicial de la proteína. La presencia de esta etiqueta no afectó el plegamiento de la proteína y no interfiere con la funcionalidad de la proteína. Además de facilitar la purificación de la proteína, la etiqueta puede ser usada para su detección y permite la inmovilización de la proteína sobre superficies meta-quelantes, lo que simplifica los estudios de la interacción de la enzima con otras proteínas. El ensayo de purificación realizado, empleando una cromatografía de afinidad al níquel-NTA, permitió hacer una purificación parcial de la CAT-2 sobre-expresada. Sin embargo hace falta optimizar y buscar estrategias eficientes para purificar la CAT-2 en cantidad y calidad suficientes para poder cristalizar la enzima. Se ha reportado que es posible realizar la cristalización de proteínas fusionadas a etiquetas y que la presencia de éstas mejora las cualidades de un cristal en algunos casos (Bucher *et al.*, 2002; Kundrot, 2004). Pero también se ha visto que para algunas proteínas como la invertasa recombinante de *Zymomonas mobilis*, el corte de la etiqueta favorece la cristalización de la misma (Vásquez Bahena J. M., 2006). De manera que será conveniente realizar un estudio para conocer si la etiqueta de histidinas favorece o interfiere la cristalización de la CAT-2 sobre-expresada.

Una de las dificultades para expresar las hemoproteínas como la CAT-2 en *E. coli* es que la mayoría de la proteína producida suele carecer del grupo hemo, que es necesario para la actividad. Esto se debe a que la velocidad de síntesis de la proteína es mucho mayor que la velocidad de biosíntesis del hemo. Se sabe que el paso limitante para la biosíntesis del hemo es la producción de ALA. Por ello, para aumentar la producción del grupo prostético se usó como estrategia agregar cantidades milimolares de ALA y de citrato férrico a los cultivos durante la expresión de la CAT-2. Se detectó cualitativamente por PAGE que con esta estrategia se logra mejorar la cantidad de enzima activa.

El ALA es un producto caro por ello se requiere emplear un método más económico que permita aumentar la producción de CAT-2 activa. Recientemente se ha descrito una estrategia interesante que podríamos utilizar y que consiste en usar una cepa de *E. coli* que expresa el gen que codifica para el receptor del hemo, el ChuA. La proteína hemo-receptora confiere a la célula huésped la habilidad para introducir eficientemente el hemo agregado al medio de cultivo durante la expresión de la proteína de interés, lo cual mejora la expresión de las hemoproteínas activas (Varnado y Goodwin, 2004).

VI. CONCLUSIONES

Se logró sobre-expresar la CAT-2 en *E. coli*.

La enzima se encuentra en el extracto soluble, es activa y se puede purificar mediante cromatografía de afinidad.

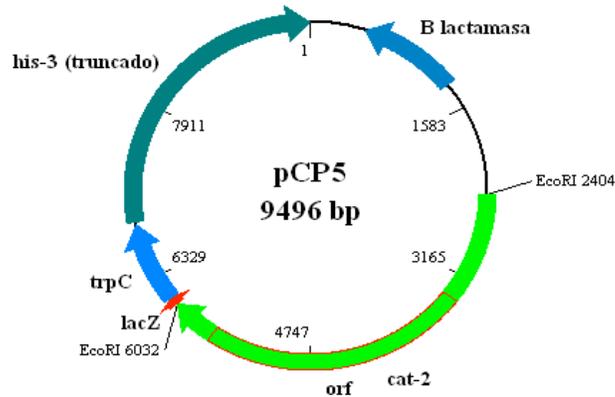
La cantidad de enzima activa aumenta cuando se agrega ALA + Fe^{III} para incrementar la producción del hemo.

La sobre-expresión de la CAT-2 en *E. coli* nos permite obtener la enzima de una manera rápida y eficiente, por lo que se usará como herramienta para realizar los estudios relacionados con la estructura de la proteína y su mecanismo catalítico.

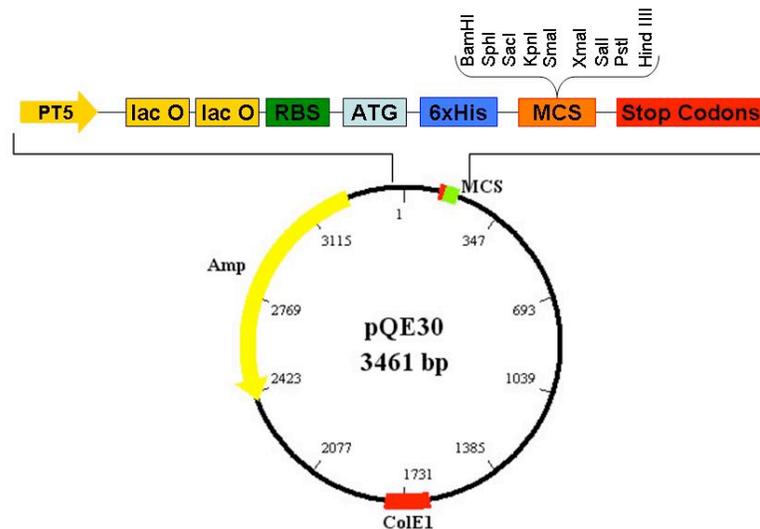
VII. PERSPECTIVAS

- 1.- Optimizar la sobre-expresión de la CAT-2 activa y la purificación de la enzima para obtenerla en una cantidad suficiente que permita cristalizarla y generar anticuerpos específicos contra la misma.
- 2.- Buscar una estrategia para cortar la etiqueta de histidinas del extremo N-terminal de la CAT-2 sobre-expresada.
- 3.- Probar en el sistema de expresión en *E. coli* diferentes mutantes del gen *cat-2* hasta encontrar una que genere una enzima monofuncional que usaremos para aclarar la relación de la enzima con el proceso de conidiación sumergida de *N. crassa*.
- 4.- Expresar en *N. crassa* las mutantes que hayan perdido sólo una de las actividades.
- 5.- Determinar el fenotipo de la cepa de *N. crassa* transformada con el gen *cat-2* mutado.
- 6.- Determinar si en la CAT-2 está presente una unión covalente entre el triptofano 90, la tirosina 238 y la metionina 264, tripéptido equivalente al encontrado en las catalasa/peroxidasa bacterianas.

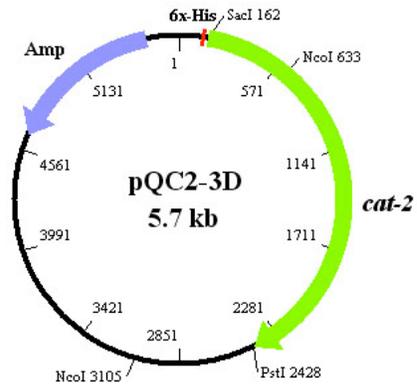
VIII. ANEXO



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



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



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

IX. REFERENCIAS

- Aguirre, J., Rios-Momberg, M., Hewitt, D., y Hansberg, W. (2005) Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol* **13**: 111-118.
- Alvarez-Delfin, K. (2002) Análisis de la función de la NADPH oxidasa NOX-2 en el hongo *Neurospora crassa*. In *Facultad de Química*. Vol. Maestría México: Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 64.
- Bandyopadhyay, P., y Steinman, H.M. (1998) *Legionella pneumophila* catalase-peroxidases: cloning of the katB gene and studies of KatB function. *J Bacteriol* **180**: 5369-5374.
- Bedard, K., y Krause, K.H. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* **87**: 245-313.
- Bertrand, T., Eady, N.A.J., Jones, J.N., Jesmin, Nagy, J.M., Jamart-Gregoire, B., Raven, E.L., y Brown, K.A. (2004) Crystal Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase. *J. Biol. Chem.* **279**: 38991-38999.
- Bistis, G.N., Perkins D. D., and Red, N. D. (2003) Cell types of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Newls* **50**: 17-19.
- Borkovich, K.A., Alex, L.A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G.E., Read, N.D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F.E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, J.E., Dunlap, J.C., Loros, J.J., Catcheside, D., Inoue, H., Aramayo, R., Polymenis, M., Selker, E.U., Sachs, M.S., Marzluf, G.A., Paulsen, I., Davis, R., Ebbole, D.J., Zelter, A., Kalkman, E.R., O'Rourke, R., Bowring, F., Yeadon, J., Ishii, C., Suzuki, K., Sakai, W., y Pratt, R. (2004) Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 1-108.
- Brown, S.M., Howell, M.L., Vasil, M.L., Anderson, A.J., y Hasset, D.J. (1995) Cloning and characterization of the katB gene of *Pseudomonas aeruginosa* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase: purification of KatB, cellular localization, and demonstration that it is essential for optimal resistance to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **177**: 6536-6544.
- Brunder, W., Schmidt, H., y Karch, H. (1996) KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* **142** (Pt 11): 3305-3315.
- Bucher, M.H., Evdokimov, A.G., y Waugh, D.S. (2002) Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. *Acta Crystallographica Section D* **58**: 392-397.
- Cano, D.N. (2006) La NADPH oxidasa NOX-1 regula la diferenciación celular en el hongo *Neurospora crassa*. In *Facultad de Ciencias*. Vol. Licenciatura México: Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 55.
- Carpena, X., Loprasert, S., Mongkolsuk, S., Switala, J., Loewen, P.C., y Fita, I. (2003) Catalase-peroxidase KatG of *Burkholderia pseudomallei* at 1.7Å resolution. *J Mol Biol* **327**: 475-489.
- Carpena, X., Wiseman, B., Deemagarn, T., Herguedas, B., Ivancich, A., Singh, R., Loewen, P.C., y Fita, I. (2006) Roles for Arg426 and Trp111 in the modulation of NADH

- oxidase activity of the catalase-peroxidase KatG from *Burkholderia pseudomallei* inferred from pH-induced structural changes. *Biochemistry* **45**: 5171-5179.
- DeYulia, G.J., Jr., Carcamo, J.M., Borquez-Ojeda, O., Shelton, C.C., y Golde, D.W. (2005) Hydrogen peroxide generated extracellularly by receptor-ligand interaction facilitates cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 5044-5049.
- Diaz, A., Horjales, E., Rudino-Pinera, E., Arreola, R., y Hansberg, W. (2004) Unusual Cys-Tyr covalent bond in a large catalase. *J Mol Biol* **342**: 971-985.
- Diaz, A., Munoz-Clares, R.A., Rangel, P., Valdes, V.J., y Hansberg, W. (2005) Functional and structural analysis of catalase oxidized by singlet oxygen. *Biochimie* **87**: 205-214.
- Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**: 47-95.
- Fraaije, M.W., Roubroeks, H.P., Hagen, W.R., y Van Berkel, W.J. (1996) Purification and characterization of an intracellular catalase-peroxidase from *Penicillium simplicissimum*. *Eur J Biochem* **235**: 192-198.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Borkovich, K.A., Selker, E.U., Read, N.D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L.J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C.B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M.A., Werner-Washburne, M., Selitrennikoff, C.P., Kinsey, J.A., Braun, E.L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G.O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Mauceli, E., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metzenberg, R.L., Perkins, D.D., Kroken, S., Cogoni, C., Macino, G., Catcheside, D., Li, W., Pratt, R.J., Osmani, S.A., DeSouza, C.P., Glass, L., Orbach, M.J., Berglund, J.A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D.O., Alex, L.A., Mannhaupt, G., Ebbole, D.J., Freitag, M., Paulsen, I., Sachs, M.S., Lander, E.S., Nusbaum, C., y Birren, B. (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* **422**: 859-868.
- Garcia, E., Nedialkov, Y.A., Elliott, J., Motin, V.L., y Brubaker, R.R. (1999) Molecular characterization of KatY (antigen 5), a thermoregulated chromosomally encoded catalase-peroxidase of *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **181**: 3114-3122.
- Ghiladi, R.A., Medzihradzky, K.F., y OrtizdeMontellano, P.R. (2005) Role of the Met-Tyr-Trp Cross-Link in *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase (KatG) As Revealed by KatG(M255I). *Biochemistry* **44**: 15093-15105.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1999) *Free radicals in Biology and medicine*. New York: Oxford University Press.
- Hansberg, T.W. (1996) A hyperoxidant state at the start of each developmental state during *Neurospora crassa* conidiation. *Ciencia e cultura* **48**: 64-74.
- Hansberg, W., y Aguirre, J. (1990) Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J Theor Biol* **142**: 201-221.
- Hansberg, W., de Groot, H., y Sies, H. (1993) Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radic Biol Med* **14**: 287-293.
- Hansberg, W. (2002) Biología de las especies de oxígeno reactivas *Mensaje Bioquímico* **XXI**: 19-54.
- Harris, J.L., Howe, H.B., Jr., y Roth, I.L. (1975) Scanning electron microscopy of surface and internal features of developing perithecia of *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **122**: 1239-1246.

- Hillar, A., Peters, B., Pauls, R., Loboda, A., Zhang, H., Mauk, A.G., y Loewen, P.C. (2000) Modulation of the activities of catalase-peroxidase HPI of *Escherichia coli* by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **39**: 5868-5875.
- Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.M., Kira, Y., Imada, I., y Utsumi, K. (2003) Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem* **10**: 2495-2505.
- Jakopitsch, C., Ruker, F., Regelsberger, G., Dockal, M., Peschek, G.A., y Obinger, C. (1999) Catalase-peroxidase from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: cloning, overexpression in *Escherichia coli*, and kinetic characterization. *Biol Chem* **380**: 1087-1096.
- Jakopitsch, C., Regelsberger, G., Furtmuller, P.G., Ruker, F., Peschek, G.A., y Obinger, C. (2002) Engineering the proximal heme cavity of catalase-peroxidase. *J Inorg Biochem* **91**: 78-86.
- Jakopitsch, C., Kolarich, D., Petutschnig, G., Furtmuller, P.G., y Obinger, C. (2003a) Distal side tryptophan, tyrosine and methionine in catalase-peroxidases are covalently linked in solution. *FEBS Lett* **552**: 135-140.
- Jakopitsch, C., Auer, M., Regelsberger, G., Jantschko, W., Furtmuller, P.G., Ruker, F., y Obinger, C. (2003b) Distal site aspartate is essential in the catalase activity of catalase-peroxidases. *Biochemistry* **42**: 5292-5300.
- Jakopitsch, C., Ivancich, A., Schmuckenschlager, F., Wanasinghe, A., Poltl, G., Furtmuller, P.G., Ruker, F., y Obinger, C. (2004) Influence of the unusual covalent adduct on the kinetics and formation of radical intermediates in *Synechocystis* catalase peroxidase: a stopped-flow and EPR characterization of the MET275, TYR249, and ARG439 variants. *J Biol Chem* **279**: 46082-46095.
- Jakopitsch, C., Droghetti, E., Schmuckenschlager, F., Furtmuller, P.G., Smulevich, G., y Obinger, C. (2005) Role of the main access channel of catalase-peroxidase in catalysis. *J Biol Chem* **280**: 42411-42422.
- Kamata, H., and Hirata, H. (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* **11**: 1-14.
- Kawasaki, L., Wysong, D., Diamond, R., y Aguirre, J. (1997) Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J Bacteriol* **179**: 3284-3292.
- Klotz, M.G., y Loewen, P.C. (2003) The molecular evolution of catalatic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from bacteria into eukaryota. *Mol Biol Evol* **20**: 1098-1112.
- Kundrot, C.E. (2004) Which strategy for a protein crystallization project? *Cell Mol Life Sci* **61**: 525-536.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H., y Aguirre, J. (2003) Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **50**: 1241-1255.
- Lefebre, M., y Valvano, M. (2001) In vitro resistance of *Burkholderia cepacia* complex isolates to reactive oxygen species in relation to catalase and superoxide dismutase production. *Microbiology* **147**: 97-109.
- Levy, E., Eyal, Z., y Hochman, A. (1992) Purification and characterization of a catalase-peroxidase from the fungus *Septoria tritici*. *Arch Biochem Biophys* **296**: 321-327.

- Littlechild, J. (1999) Haloperoxidases and their role in biotransformation reactions. *Curr Opin Chem Biol* **3**: 28-34.
- Lledias, F., Rangel, P., y Hansberg, W. (1998) Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem* **273**: 10630-10637.
- Long, S., y Salin, M.L. (2000) Archaeal promoter-directed expression of the *Halobacterium salinarum* catalase-peroxidase gene. *Extremophiles* **4**: 351-356.
- Loprasert, S., Whangsuk, W., Sallabhan, R., y Mongkolsuk, S. (2003) Regulation of the katG-dpsA operon and the importance of KatG in survival of *Burkholderia pseudomallei* exposed to oxidative stress. *FEBS Lett* **542**: 17-21.
- Malagnac, F., Lalucque, H., Lepere, G., y Silar, P. (2004) Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genet Biol* **41**: 982-997.
- Manca, C., Paul, S., Barry, C.E., 3rd, Freedman, V.H., y Kaplan, G. (1999) *Mycobacterium tuberculosis* catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes in vitro. *Infect Immun* **67**: 74-79.
- Michan, S., Lledias, F., Baldwin, J.D., Natvig, D.O., y Hansberg, W. (2002) Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. *Free Radic Biol Med* **33**: 521-532.
- Muller, B.T., y Russo V. R. A. (1989) Nitrogen starvation or glucose limitation induces conidiation in constantly shaken liquid cultures of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics Newsletter* **36**: 58-60.
- Navarro, R.E., Stringer, M.A., Hansberg, W., Timberlake, W.E., y Aguirre, J. (1996) catA, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr Genet* **29**: 352-359.
- Ng, V.H., Cox, J.S., Sousa, A.O., MacMicking, J.D., y McKinney, J.D. (2004) Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst. *Mol Microbiol* **52**: 1291-1302.
- Nohl, H., Gille, L., y Staniek, K. (2005) Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem Pharmacol* **69**: 719-723.
- Paris, S., Wysong, D., Debeaupuis, J.P., Shibuya, K., Philippe, B., Diamond, R.D., y Latge, J.P. (2003) Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **71**: 3551-3562.
- Peraza, L., y Hansberg, W. (2002) *Neurospora crassa* catalases, singlet oxygen and cell differentiation. *Biol Chem* **383**: 569-575.
- Peraza, L. (2005) Caracterización genética y enzimática de una catalasa-peroxidasa de *Neurospora crassa*. In *Instituto de Fisiología Celular Vol. Doctorado México: Universidad Nacional Autónoma de México*, pp. 115.
- Pongpom, P., Cooper, C.R., Jr., y Vanittanakom, N. (2005) Isolation and characterization of a catalase-peroxidase gene from the pathogenic fungus, *Penicillium marneffei*. *Med Mycol* **43**: 403-411.
- Raju, N.B. (1980) Meiosis y ascospore genesis in *Neurospora*. *Eur. J. Cell Biol.* **23**: 208-223.
- Raju, N.B. (2003) Introduction to *Neurospora* biology y genetics, a cytological perspective.
- Regelsberger, G., Jakopitsch, C., Ruker, F., Krois, D., Peschek, G.A., y Obinger, C. (2000) Effect of distal cavity mutations on the formation of compound I in catalase-peroxidases. *J Biol Chem* **275**: 22854-22861.
- Rouse, D.A., DeVito, J.A., Li, Z., Byer, H., y Morris, S.L. (1996) Site-directed mutagenesis of the katG gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. *Mol Microbiol* **22**: 583-592.

- Rubio, R.M.E. (2001) Las catalasas y la diferenciación celular en *Bacillus cereus cereus*. In *Facultad de Ciencias*. Vol. Maestría México: Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 44.
- Sauer, H., Wartenberg, M., y Hescheler, J. (2001) Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* **11**: 173-186.
- Scherer, M., Wei, H., Liese, R., and Fischer, R. (2002) *Aspergillus nidulans* catalase-peroxidase gene (*cpeA*) is transcriptionally induced during sexual development through the transcription factor StuA. *Eukaryot Cell* **1**: 725-735.
- Singh, R., Wiseman, B., Deemagarn, T., Donald, L.J., Duckworth, H.W., Carpena, X., Fita, I., y Loewen, P.C. (2004) Catalase-peroxidases (KatG) exhibit NADH oxidase activity. *J Biol Chem* **279**: 43098-43106.
- Toledo, I., Noronha-Dutra, A.A., y Hansberg, W. (1991) Loss of NAD(P)-reducing power and glutathione disulfide excretion at the start of induction of aerial growth in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **173**: 3243-3249.
- Varnado, C.L., y Goodwin, D.C. (2004) System for the expression of recombinant hemoproteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **35**: 76-83.
- Vásquez Bahena J. M., W.S.P., Mikolajek H., Santiago H. J.A., Vallejo B. V., (2006) Efecto de la remoción del TAG-S en la cristalización de la invertasa recombinante de *Zymomonas mobilis*. CINVESTAV.
- Wada, K., Tada, T., Nakamura, Y., Kinoshita, T., Tamoi, M., Shigeoka, S., y Nishimura, K. (2002) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of catalase-peroxidase from *Synechococcus* PCC 7942. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 157-159.
- Welinder, K.G. (1991) Bacterial catalase-peroxidases are gene duplicated members of the plant peroxidase superfamily. *Biochim Biophys Acta* **1080**: 215-220.
- Welinder, K.G. (1992) Superfamily of plant, fungal y bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* **2**: 388-393.
- Wilson, M.L., Stone, B.L., Hildred, M.V., y Reves, R.R. (1995) Comparison of recovery rates for mycobacteria from BACTEC 12B vials, Middlebrook 7H11-selective 7H11 biplates, and Lowenstein Jensen slants in a public health mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* **33**: 2516-2518.
- Yamada, Y., Fujiwara, T., Sato, T., Igarashi, N., y Tanaka, N. (2002) The 2.0 Å crystal structure of catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. *Nat Struct Biol* **9**: 691-695.
- Yoshida, Y., y Hasunuma, K. (2004) Reactive oxygen species affect photomorphogenesis in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* **279**: 6986-6993.
- Zamocky, M., Regelsberger, G., Jakopitsch, C., y Obinger, C. (2001) The molecular peculiarities of catalase-peroxidases. *FEBS Lett* **492**: 177-182.
- Zamocky, M. (2004) Phylogenetic relationships in class I of the superfamily of bacterial, fungal, and plant peroxidases. *Eur J Biochem* **271**: 3297-3309.