2010B-2014B 207547676

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Cristalización de la catalasa-peroxidasa de *Neurospora crassa*

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

Elena Lizbeth García Villegas

Las Agujas, Zapopan, Jal., Noviembre de 2015

Al universo que siempre ha conspirado para que ocurra lo apropiado en mi vida…
Aunque algunas veces no me parezca.

Agradecimientos

A la Dra. Adelaida Díaz Vilchis por su paciencia, dedicación y tolerancia durante la realización de este trabajo, por las innumerables revisiones así como por la oportunidad de poder incorporarme a este proyecto y sobre todo por permitirme aprender de sus experiencias como investigadora.

Al Dr. Enrique Rudiño, muchas gracias por apoyarme durante las dos estancias que he realizado en su laboratorio, por darme la oportunidad de cumplir mi sueño de ser bióloga, gracias por seguir confiando en mí, pero sobre todo gracias por enseñarme que las grandes almas todavía existen.

A la bióloga más linda del universo Sonia Rojas, gracias por seguirme enseñando un poquito de todo lo que sabes día con día, por las horas de platica y tu apoyo. Gracias por los abrazos mañaneros que hacían mis días mucho más fáciles. Estoy convencida que si las personas fuéramos un 5% más como tú el mundo seria perfecto.

A la Dra. Rayana Ruiz por ayudarme con los experimentos de DLS, así como explicarme a interpretar los datos, por sus revisiones a la tesis pero sobre todo por sus consejos y dedicación por enseñarme a ver el mundo desde la perspectiva de un químico. Ray gracias por apoyarme, escucharme a las 12 am, por los “en media hora regresamos a la casa” que jamás sucedieron, por enseñarme a cocinar y por contribuir a que mi guardaropa se volviera un poco más obscuro día con día, pero sobre todo por aguantarme 24 hrs del día durante cuatro meses seguidos, eres la mejor roomie del planeta.

A la M.C. Vannesa Vega y al Dr. Wilhelm Hasberg del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por proporcionarnos la enzima CAT-2 con la que pudimos realizar este trabajo de tesis.

Al jurado de examen de grado integrado por la Dra. Ana Lilia Vigueras, la Dra. Anne Santerre, la Mtra Rosa María Domínguez y al Dr. Liberato Portillo. Gracias por haberse tomado el tiempo de revisar mi tesis así como su paciencia durante los tramites que fueron requeridos durante este proceso.

A la bióloga Arisbeth Almeida por sus incontables revisiones a esta tesis, tanto presenciales como a distancia. Así como también por ser mi primer amiga en esta aventura que comencé en la ciudad de Cuernavaca; por tus consejos, abrazos y sobre todo por tantas horas de risas juntas.

Al biólogo Miguel Díaz de León por ayudarme con las revisiones a este trabajo, por tener las palabras de aliento adecuadas cuando estuve a punto de botar todo y

salir corriendo a Guadalajara. Pero sobre todo gracias por disminuir mi soledad cuando más lo necesite.

A Diego Rivas, que sin importar la distancia siempre ha encontrado la manera de apoyarme, alentarme y preocuparse por mí, pero sobre todo gracias por creer en una desconocida (tú sabes porque lo digo).

Al grupo de biólogas más locas que he tenido el gusto de conocer y que puedo llamar “mis amigas” Kika, Lupita y Naye. Nunca voy a olvidar las horas de diversión, risas, charlas, paseos y viajes juntas. Ojala algún día encuentre la manera de agradecerles todo lo que han hecho por mí pero sobre todo por entender que antes de ser Liz soy bióloga, ha sido un verdadero placer coincidir en este universo.

Al biólogo-gastronómo Jesús Hernández, gracias por desvelarte conmigo incluso a distancia y ayudarme con los trámites en CUCBA aun cuando la situación se volvía muy adversa.

A todos mis compañeros del Laboratorio Yasel, Hugo, Rive, Adam, Chucho, Víctor, Santos, Antony, Cesar, Osvaldo, Ulices, Murhy, Aris, Edith, Bere, Soni y Ray, que sin sus consejos y apoyo este trabajo no hubiera sido posible. Así como por las horas de diversión dentro y fuera del laboratorio.

A las mejores roomies que he tenido; Ari gracias por enseñarme lo que es la disciplina. Deni gracias por darme alegría. Rossy gracias por tu tiempo, tu carisma, tus atenciones y sobre por enseñarme a dar todo sin esperar nada a cambio. Anel nunca tendré una compañera igual con la cual reír y ver las novelas on-line. Ray gracias por prepararme de comer tan rico. Sin su apoyo a diario no hubiera sobrevivido a Cuernavaca.

A las instituciones que me apoyaron para realizar la estancia en la ciudad de Cuernavaca Morelos, la SEP, el IBT-UNAM y a la UDG especialmente a Sonia y al Ing. Rene por apoyarme con los tramites de becas durante mi estancia en el CUCBA.

Al biólogo Roberto Estupiñán por las charlas a distancia y por qué aunque yo le di un millón de razones para que se fuera siempre ha estado en los momentos más difíciles. Gracias por siempre recordarme que tengo las manos heladas.

A la música que sin importar lo difícil de mi día siempre ha sido capaz de hacerme sentir mejor.

Y sobre todo quiero agradecer a mis padres, que aun con mis locuras, errores y defectos siempre me han apoyado

“*Por qué lo difícil se consigue y lo imposible se intenta”*

CONTENIDO

Lista de figuras 7

Lista de tablas 11

Abreviaturas 12

Resumen 13

I. Introducción

Neurospora crassa 16

El peróxido de hidrógeno y las oxidorreductasas 17

Las catalasas-peroxidasas 18

Centro catalítico y residuos conservados en las catalasas-peroxidasas 21

Mecanismo de reacción de las catalasas-peroxidasas 23

La Biología Estructural y la Cristalografía de Rayos X 25

La aplicación de dispersión dinámica de luz en la cristalización de proteínas 26

La cristalización de proteínas 27

II. Antecedentes 30

La catalasa-peroxidasa de *Neurospora crassa* (CAT-2) 31

Planteamiento del problema 33

Hipótesis 34

Objetivos 37

III. Materiales y métodos

Sobreexpresión y purificación de la CAT-2 35

Cromatografía de intercambio aniónico 35

Cromatografía de exclusión molecular 36
Determinación del punto isoeléctrico de la CAT-2 36
Análisis de la CAT-2 por dispersión dinámica de luz (DLS) 36
Cristalización de la CAT-2 37
Optimización de la cristalización de la CAT-2 37
Difracción de Rayos X de los cristales de CAT-2 42
Análisis de la secuencia y generación de un modelo de la CAT-2 42
IV. Resultados y Discusión
Purificación de la CAT-2 43
Cromatografía de Intercambio aniónico 44
Cromatografía de exclusión molecular 45
Determinación del punto isoeléctrico de la CAT-2 46
Análisis de la CAT-2 por dispersión dinámica de luz (DLS) 47
Cristalización de la CAT-2 59
Optimización de la cristalización de la CAT-2 59
Difracción de rayos X de los cristales de CAT-2 60
Análisis de la secuencia y generación de un modelo de la CAT-2 62
V. Conclusiones 66
VI. Perspectivas 67
VII. Bibliografía citada 78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esporas asexuales de *Neurospora crassa*. Blastoconidios **(A)**, Artroconidios **(B)**, Microconidios **(C)** (Tomada y modificada de Peraza, 2005) **(D)** Hifas vegetativas (Tomada y modificada de Vega, 2007)…….……..17

Figura 2. Estructura cristalográfica de la CP de *Mycobacterium tuberculosis* (*mt*CP). (A) Estructura global del homodímero, la subunidad 1 se presenta en color rosa y morado, la subunidad 2 se muestra en morado y azul. El grupo hemo en color gris está presente en cada subunidad en el dominio N-terminal. **(B)** Representación esquemática del homodímero de la *mt*CP**. (C)** Representación del monómero de *mt*CP, en color morado se presenta el dominio C-terminal y en lila el dominio N-terminal donde se encuentra alojado el grupo hemo en color gris (Tomada y modificada de Bertrand *et al.,* 2004)……..…….....20

Figura 3. Relación de tres de las actividades de las CP´s. (A) Hidrazinólisis del ácido isonicotínico. **(B)** Isonicotinoyl-NAD sintasa. **(C)** Actividades de NADH oxidasa. (Tomado y modificado de Singh *et al*.,2004)……..…21

Figura 4. Entorno de la cavidad del hemo de las CP´s. (A) Superposición de los residuos del sitio activo de la CP de *Haloarcula marismortui* (amarillo), *Synechocystis* sp.PCC 6803 (numerados entre paréntesis) y una citocromo c peroxidasa (gris). **(B)** Sitio distal del hemo, los residuos fueron numerados a partir de la secuencia de *H. marismortu,* entre paréntesis están los residuos de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y las moléculas de agua (W) **(C)** El aducto covalente de las CP´s con el mapa de densidad electrónica en verde, los residuos fueron numerados a partir de la secuencia de *H. marismortui,* entre paréntesis están los residuos de *Synechocystis.* (Tomada y modificada de Smulevich *et al*., 2006)……..…….…….……..22

Figura 5. Estructura de las asas características de las CP´s. Diagrama estructural de la inserción de las tres asas largas en *H. marismortui* y su orientación respecto a los residuos del centro activo. **(B)** Asa LL1 conectando el sitio distal con las hélices E (amarillo) y F (rojo). Las coordenadas se tomaron de *H. marismortui,* pero los residuos fueron numerados con la secuencia de *Synechocystis* sp PCC 6803. En el lado distal los

residuos forman el aducto covalente (Tomado y modificado de Smulevich *et al.*, 2006)……..……..…….24

Figura 6. **Mecanismo catalítico de las CP´s.** En la parte superior se muestra la actividad de catalasa y la formación del compuesto I, en la parte inferior se presenta la actividad de peroxidasa y la formación del compuesto II, que después regresa al estado inicial (Tomado y modificado de Vega, 2011)…….……25

Figura 7. Estructucturas depositadas en el PDB. La gráfica muestra las técnicas por las que se han determinado las macromoléculas depositadas en el Protein Data Bank (PDB) (Tomada y modificada del PDB)…….….27

Figura 8. Cristales de proteína. Microfotografías de cristales de proteínas en crecimiento. **(A, B, F y G)** corresponden a cristales obtenidos con un kit comercial. **(D, E y C)** son cristales de virus del mosaico del tabaco. **(H)** Cristales del virus *Desmodium* e **(I)** son cristales de canavalina (tomado y modificado de McPherson y Gavira, 2014)……29

Figura 9. **Técnicas de cristalización de proteínas**. **(A)** Ilustración del método de difusión de vapor de la gota sentada. **(B)** Gota colgante. **(C)** Método de microdiálisis. (Tomada y modificada de McPherson, 2004)…….……...30

Figura 10. Estructuras cristalográficas de las CP´s depositadas en el PDB. (A) CP de *Burkholderia pseudomallei* a 1.7 Å. **(B)** CP de *Sinechococcus elongatus* a 2.12 Å. **(C)** CP de *Mycobacterium tuberculosis* a 2 Å. **(D)** Dominio C-terminal de la enzima de *Escherichia coli.* ***(E)*** CP de *Haloarcula marismortui* a 2 Å y **(F)** CP de *Magnaporthe grisea* a 1.55 Å (Estructuras tomadas y modificadas del PDB)…….....……..31

Figura 11. Modelo de la CAT-2. La figura nos muestra un modelo de la CAT-2 generado por homología de secuencia con la estructura cristalográfica de *B. pseudomallei* que tiene 60% de identidad de secuencia con la CAT-2. **(A)** Representación del homodímero y los grupos hemo. **(B)** Estructura del homodímero rotada 90° en el plano de Y. (Tomado y modificado de Peraza, 2011)…….……..33

Figura 12. SDS-PAGE de la CAT-2. El gel está al 10% de concentración y en él se observa una banda enriquecida de 83.4 kDa que corresponde a la CAT-2. El gel representa el primer paso de purificación de la CAT-2 que es una cromatografía de afinidad con una columna de quitina. (SDS-PAGE realizado por Vanessa Vega)……..43

Figura 13. Cromatografía de intercambio aniónico. (A). Cromatograma del primer lote de CAT-2. Aquí se utilizó la columna de intercambio aniónico Q-sefarosa y en la figura se muestra la elusión de la enzima. **(B)** SDS-PAGE al 10% de las fracciones colectadas de la cromatografía. En el gel se corrieron muestras de las fracciones 21 a 26. El marcador de masa molecular (M) y una muestra de la CAT-2 antes de la cromatografía se utilizaron como controles..……...…….…..44

Figura 14. Cromatografía de exclusión molecular. (A) Cromatograma de exclusión molecular. Se muestran las fracciones que contienen la CAT-2**. (B)** SDS-PAGE al 10% de las fracciones de la cromatografía. Se observa que la CAT-2 se encuentra enriquecida..43

Figura 15. Punto isoeléctrico de la CAT-2. En los carriles 1 y 2 del gel de isoelectroenfoque se encuentra la muestra de la CAT-2, mientras en el carril 3 se observa el marcador de pH.……..…….……46

Figura 16. Efecto de la temperatura sobre el diámetro hidrodinámico de la CAT-2. La línea azul hace referencia a la tendencia del comportamiento del diámetro hidrodinámico de la CAT-2 en solución ……..…….48

Figura 17. Graficas obtenidas del experimento de dispersión dinámica de luz. (A) Experimento con amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7.5. **(B)** Experimento con amortiguador de Arginina 50 mM, pH 7.5. **(C)** Experimento con amortiguador de fosfato dibásico de sodio/fosfato monobásico de potasio 50mM, pH 6.2.….……....50

Figura 18. Cristales de la enzima CAT-2. (A) Cristales de la CAT-2 obtenidos en la condición E1 del kit “Crystal Screen Lite” en un amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7.5. (**B)** Cristales obtenidos en la condición F2 del kit “Wizard 2”. **(C)** Cristales obtenidos en la gota D3 del kit “Crystal Screen Lite”. **(D)** Cristales obtenidos en la gota H6 del kit “Crystal Screen Cryo”. **(E)** Cristales obtenidos en la condición F1 del kit “Index 2”. **(F)** Cristales de la CAT-2 obtenidos en la gota F6 del kit “Index 2”. (**G)** Cristales de la CAT-2 obtenidos en las gotas A3 del kit “Crystal Screen Lite”. **(H)** Cristales obtenidos en la gota D3 del kit “Crystal Screen Lite”. **(I)** Cristales obtenidos en la gota B2 del kit “Crystal Screen 1”…...53

Figura 19. Cristales de enzima CAT-2 obtenidos con la técnica de “Batch”. (A) Cristales encontrados en la gota E4 del kit “Crystal Screen 2”. **(B)** Cristales encontrados en la gota F7 del kit “Index 2”……54

Figura 20. Resultados del programa XtalPred. La figura nos muestra las estadísticas y el orden de los aminoácidos ubicando los sitios desordenados de la enzima……..56

Figura 21. Cristales de la enzima CAT-2. (A) Cristales de la CAT-2 obtenidos en la condición A12 del kit “Crystal Screen 1” con un amortiguador de Arginina 50 mM, pH 7.5. **(B)** Cristales obtenidos en la condición D10 del kit “Wizard 1” en un amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.5. **(C y D)** Esferulitas encontradas en las pruebas de cristalización……..…….57

Figura 22. Patrones de difracción de la CAT-2. (A) Patrón de difracción del cristal encontrado en la gota A12 del kit “Crystal Screen 1” a un costado la imagen del cristal antes de ser difractado **(B)** Patrón de difracción del cristal encontrado en la gota F1 del kit “Index 2” a un costado la imagen del cristal antes de ser difractado……61

Figura 23. Alineamiento de las secuencias de las CP´s que cuentan con estructura cristalográfica junto con la CAT-2. El alineamiento se realizó con las secuencias de *B. pseudomallei, M. tuberculosis, E. coli, S. elongatus, H. marismortui y M. grisea.* Al final del alineamiento se incluyó la secuencia de la CAT-2 de *N. crassa*. Se indican algunos de los residuos importantes para la catálisis de las CP´s en recuadros color verde, los residuos del aducto covalente en recuadros color azul y los residuos encargados de controlar el acceso al lado distal del hemo en morado (Alineamiento realizado con el programa BioEdit)…….62

Figura 24. Modelo de la CAT-2. (A) Vista del monómero de la enzima donde se muestra el asa larga que pertenece al dominio N-terminal. **(B)** Vista del dímero de la CAT-2 rotado sobre el eje de las Z. (Modelo y figuras generadas con el programa SWISS MODEL). **(C)** Dímero de la CAT-2. En la imagen se observan las asas LL1 y LL2 encargadas de conducir el H_2O_2 al grupo hemo. **(D)** Vista de algunas interacciones intramonoméricas importantes para la formación del dímero de la CAT-2. (Las Imágenes se generaron con las coordenadas de SWISS MODEL en el programa WinCoot)…….65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Matriz de optimización E1. La tabla muestra la variación de las concentraciones de la solución madre para la optimización de la cristalización de la condición E1 del kit "Crystal Screen Lite"..……..……..…...38

Tabla 2. Matriz de optimización A12. La tabla muestra la variación de las concentraciones de la solución madre para la optimización de la cristalización de la condición A12 del kit "Crystal Screen 1"…….39

Tabla 3. Matriz de optimización D10. La tabla muestra la variación de las concentraciones de la solución madre para las pruebas de cristalización de la condición D10 del kit "Wizard 1"……..……40

Tabla 4. Matriz de optimización F2. La tabla muestra la variación de las concentraciones de la solución madre para las pruebas de cristalización de la condición F2 del kit "Wizard 2"……..……..……..…….40

Tabla 5. Matriz de optimización D3. La tabla muestra la variación de las concentraciones de la solución madre para la optimización de la condición D3 del kit "Crystal Screen Lite"…….……..…….…..41

Tabla 6. Tabla comparativa de los tres lotes de la CAT-2. En la tabla se observan las diferentes pruebas a las que fueron sometidos los lotes de CAT-2 que se recibieron con el fin de garantizar mejores resultados.……..…….……46

Tabla 7. Tabla comparativa del radio hidrodinámico de la CAT-2 en diferentes amortiguadores obtenido con un equipo de DLS.…….……..49

Tabla 8. Condiciones de cristalización encontradas para la CAT-2…….…..52

Tabla 9. Identidad de secuencia de la CAT-2 con otras CP´s……..….64

ABREVIATURAS

CAT-1	Catalasa monofuncional 1 de *Neurospora crassa*
CAT-2	Catalasa-peroxidasa de *N. crassa*
CAT-3	Catalasa monofuncional 3 de *N. crassa*
CAT-4	Catalasa monofuncional 4 de *N. crassa*
CP´s	Catalasas-peroxidasas
DLS	Dispersión dinámica de luz
***mt*CP**	Catalasa-peroxidasa de *Mycobacterium tuberculosis*
MPD	2-Methyl-2,4-pentanediol
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
pI	Punto isoeléctrico
PEG	Polietilenglicol
RE	Amortiguador Arginina-glutamato
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Especies de oxigeno reactivas
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con SDS.

Resumen

Las catalasa-peroxidasas (CP´s) son enzimas bifuncionales que han sido consideradas de interés por dos razones, la primera es que son las únicas peroxidasas con alta actividad de catalasa y la segunda por su participación en la activación del fármaco anti-tuberculosis llamado isoniazida.

El plegamiento y la arquitectura del sitio activo de las CP's son típicos de una peroxidasa. Sin embargo, mientras las peroxidasas se presentan como monómeros, las CP´s son homodímeros u homotetrámeros. Cada subunidad está formada por un dominio N-terminal y otro C-terminal.

El sitio activo de las CP's es un protohemo IX localizado en el dominio N-terminal, que presenta una triada altamente conservada His/Trp/Asp, donde el Trp forma un aducto covalente con los residuos Tyr/Met encargados de la actividad catalítica de la enzima. Además, las CP's presentan tres asas largas denominadas LL1, LL2 y LL3, de las cuales LL1 y LL2 se encargan de restringir el paso del sustrato al centro activo.

Hasta la fecha son pocos los estudios bioquímicos reportados para CP´s y sólo están depositadas seis estructuras cristalográficas en el PDB (Protein Data Bank), cuatro son de bacterias, una de arquea y una de eucariontes. Por lo anterior, en este trabajo se planteó como objetivo principal cristalizar la CP de *Neurospora crassa* denominada CAT-2.

Previamente se clonó el gen de la CAT-2 en el vector pTYB1 y se expresó en *Escherichia coli*. Posteriormente la enzima fue purificada por cromatografía con una columna de afinidad. También se utilizó una columna de intercambio aniónico o una columna de exclusión molecular. Se determinó el punto isoeléctrico de la enzima utilizando un equipo Phastsystem obteniendo un valor de pI experimental de 5, que es similar al teórico.

Los análisis de dispersión dinámica de luz (DLS) mostraron la capacidad termoestable de la CAT-2 en altas temperaturas (40°C), además de revelar la pureza de la muestra ya que durante estos ensayos la enzima se mantuvo homogénea y monodispersa en solución, aún con la implementación de tres amortiguadores diferentes.

Se realizaron pruebas de cristalización de la CAT-2 con el método de "batch" y también pruebas de gota colgante y gota sentada utilizando el robot de cristalización "Mosquito LCP". Una vez que se encontraron las condiciones de cristalización se realizaron matrices de optimización y escalado, en las que se varió la concentración de las soluciones madre con el fin de conseguir mejores cristales. De los cristales que se obtuvieron, nueve fueron congelados y difractados en líneas de los sincrotrones de Brookhaven y Stanford. Así, se comprobó que eran cristales de la enzima. Aunque desafortunadamente ninguno presentó la calidad suficiente para realizar una colecta de datos y determinar la estructura cristalográfica de la CAT-2.

Con el fin de conocer más sobre la CAT-2 se realizaron dos análisis de su secuencia utilizando los programas XtalPred y ProtParam. Los resultados de XtalPred indicaron que la CAT-2 es una enzima difícil de cristalizar, ya que presenta regiones desordenadas en su secuencia. Con ProtParam se determinaron algunos parámetros teóricos de la CAT-2, como la masa molecular y el pI. También, su secuencia fue alineada con las secuencias de las otras CP´s que tienen determinada su estructura cristalográfica utilizando el programa BioEdit para identificar los residuos de aminoácidos importantes en la CAT-2. Asimismo a estas secuencias se les realizó un análisis de BLAST para determinar el porcentaje de identidad entre la CAT-2 y otras CP's. Finalmente, se generó un modelo tridimensional con la secuencia de la CAT-2, con el fin de analizar algunas características de la enzima. El modelo se construyó considerando la identidad de la CAT-2 y las otras CP´s cuya estructura se conoce, especialmente con la CP de *Magnaporthe grisea* con la que tiene un 62% de identidad de secuencia. El modelo se realizó utilizando el programa SWISS MODEL de ExPASy. En el modelo de la

CAT-2 observamos que es muy parecido a la estructura cristalográfica de *M. grisea*.

Introducción

Neurospora crassa

Neurospora crassa es un hongo filamentoso, heterotáltico, que pertenece a la familia Sordariaceae del Filo Ascomycota. Su distribución es ubicua, se encuentra principalmente en las áreas tropicales y subtropicales, así como en campos agrícolas. Es uno de los principales colonizadores de bosques incendiarios y se ha utilizado como modelo experimental desde 1920 (Vega, 2007).

Los hongos poseen diferentes vías alternas de propagación y reproducción. La mayor parte de ellas involucra procesos de diferenciación celular que culminan con la formación de esporas que pueden ser de origen sexual o asexual. El proceso de formación de las esporas asexuales en *Neurospora crassa* ocurre por la división mitótica de las mismas originando conidios, se pueden formar dos tipos de conidios: los microconidios y los macroconidios. Los macroconidios son esporas multinucleadas que dependiendo de su origen pueden ser blastoconidios o artroconidios, mientras que los microconidios son esporas más pequeñas y uninucleadas. El proceso de conidiación puede inducirse por la exposición del hongo al aire y a la luz (Figura 1) (Peraza, 2005; Vega, 2007; Vega, 2011).

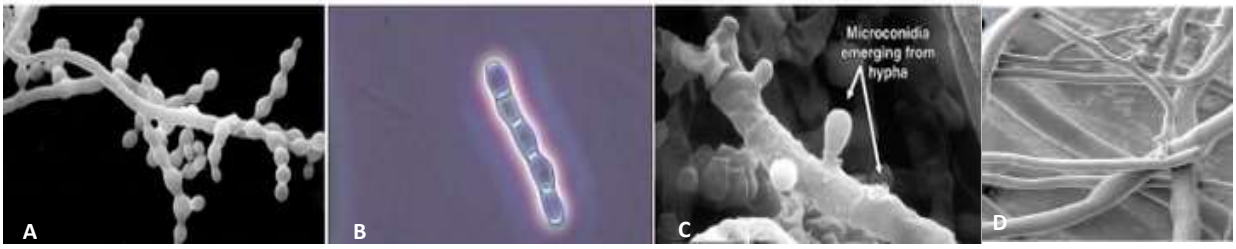


Figura 1. Esporas asexuales de *Neurospora crassa*. (A) Blastoconidios **(B)** Artroconidios **(C)** Microconidios (Tomada y modificada de Peraza, 2005) **(D)** Hifas vegetativas (Tomada y modificada de Vega, 2007).

El proceso de formación de esporas asexuales, llamadas conidios comprende tres transiciones morfogénicas. En la primera de las transiciones se observa la adhesión de las hifas en crecimiento durante los primeros 40 min de exposición al

aire, durante la segunda ocurre la formación del micelio aéreo aproximadamente 2 horas después y en la última se presenta la formación de los conidios de 9 a 10 horas después. Al inicio de cada una de las transiciones existe un estado hiperoxidante que se caracteriza por el incremento en la oxidación de las proteínas. Lo anterior se sabe por el notable incremento en las enzimas antioxidantes, la pérdida del poder reductor y la detección de quimioluminiscencia producida por especies de oxígeno reactivas (ROS) (Hansberg y Aguirre, 1990; Hansberg *et al*., 1993; Vega, 2007;).

Uno de los principales mecanismos de defensa antioxidante de las células consiste en eliminar las especies del oxígeno reactivas como el superóxido y el peróxido de hidrógeno (Peraza, 2005).

El peróxido de hidrógeno y las oxidorreductasas

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un subproducto nocivo del metabolismo aerobio que también actúa como segundo mensajero en rutas de transducción de señales, es la especie de oxígeno reactiva más abundante de la bíosfera y es capaz de atravesar la membrana celular (Takemoto *et al*., 2007; Zámocký, 2009). Se han encontrado evidencias que sugieren que la función de señalización del H_2O_2 fue adquirida a lo largo de la evolución (Zámocký, *et al*., 2008).

Durante la diferenciación celular, el H_2O_2 es rápidamente removido por varias oxidorreductasas siendo esto un proceso esencial para la homeostasis (Peraza, 2005). Las células evolucionaron no solo con enzimas capaces de dismutar el H_2O_2 (hemo-catalasas, manganeso-catalasas y las catalasas-peroxidasas), sino también con enzimas capaces de reducir el peróxido de hidrógeno con la ayuda de varios donadores de electrones (hemo peroxidasas y las no-hemo peroxidasas) (Zámocký *et al*., 2009).

Las catalasas monofuncionales se encargan de dismutar el peróxido de hidrógeno en O_2 y dos moléculas de agua. Son enzimas tetraméricas que contienen como grupo prostético un hemo por subunidad, algunas son muy resistentes a solventes orgánicos y a agentes desnaturalizantes y se inactivan

específicamente con el 3-amino-1,2,4-triazol. Como hemoproteínas, las catalasas se inactivan con azida e hidroxilamida y se inhiben con cianuro (Díaz, 2004; Domínguez *et al.,* 2010). Tienen una amplia distribución en organismos aerobios como bacterias, arqueas y eucariontes (Díaz *et al*., 2012). También son unas de las enzimas más eficientes que se conocen (Vega, 2007).

Las manganeso-catalasas llamadas también pseudocatalasas por el hecho de utilizar iones manganeso en su centro activo, representan el grupo minoritario de la familia de las catalasas y se originaron a partir del genoma bacteriano. Estas enzimas son hexaméricas y sólo están presentes en algunos organismos procariontes anaerobios (Zámocký y Koller, 1999; Díaz, 2004).

Las peroxidasas son un grupo extenso y heterogéneo que se encarga de catalizar la reducción de los peróxidos, entre ellos el H_2O_2. Las hemo-peroxidasas presentan el grupo hemo como grupo prostéico, pero otras utilizan átomos de vanadio, selenio o cisteína. Se dividen en dos grandes superfamilias, las hemo-peroxidasas de los animales y las hemo-peroxidasas de hongos, plantas y bacterias. Esta última se divide en tres clases de acuerdo con su localización y función. Así, la lignina peroxidasa pertenece a la clase II, las peroxidasas de secreción de las plantas a la clase III, la citocromo c peroxidasa y las catalasas peroxidasas pertenecen a la clase I (Vega, 2007).

Las catalasas-peroxidasas

Las catalasas-peroxidasas (CP´s) son enzimas bifuncionales presentes en bacterias, arqueas, hongos y algunos protistas (Singh, 2008). Son consideradas las únicas peroxidasas que presentan una alta actividad como catalasa y como peroxidasa.

El plegamiento y la arquitectura del sitio activo de las CP´s es el típico de una peroxidasa y por homología son consideradas como miembros de la clase I de la superfamilia de las hemo-peroxidasas, junto con las ascorbato peroxidasas y las citocromo c peroxidasas (Zamocky *et al.,* 2008). Sin embargo, mientras las peroxidasas se presentan normalmente como monómeros, las CP´s existen como

homodímeros u homotetrámeros de ~80 kDa por subunidad (Figura 2) (Singh *et al*., 2008).

Su sitio activo es bifuncional y contiene un grupo prostético conocido como protohemo IX, que está contenido en el dominio N-terminal y aunque el dominio C-terminal también presenta la arquitectura de unión para el grupo hemo, este no lo presenta (Figura 2B). No se conoce la función del dominio C-terminal (Baker *et al.,* 2004).

En un principio las CP´s se definieron por su dualidad funcional y sus propiedades cinéticas (Hochman y Goldberg, 1991). Su actividad de catalasa tiene un pH óptimo que va de 6.0 a 6.5, mientras para la actividad peroxidasa va de 4.0 a 5.5 de pH. En cambio las catalasas monofuncionales presentan una meseta de actividad que va de pH 5 a 11 (Vega, 2007).

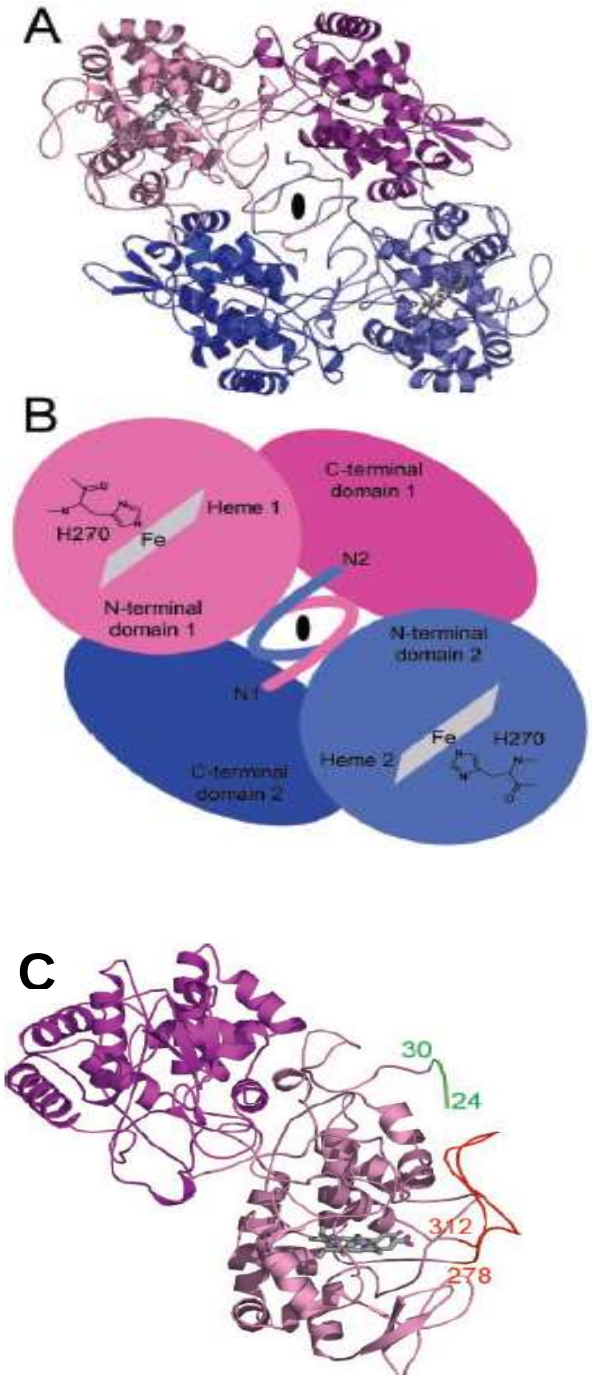


Figura 2. Estructura cristalográfica de la CP de *Mycobacterium tuberculosis* (*mt*CP). (A) Estructura global del homodímero, la subunidad 1 se presenta en color rosa y morado, la subunidad 2 se muestra en morado y azul. El grupo hemo en color gris está presente en cada subunidad en el dominio N-terminal. **(B)** Representación esquemática del homodímero de la *mt*CP**. (C)** Representación del monómero de *mt*CP, en color morado se presenta el dominio C-terminal y en lila el dominio N-terminal donde se encuentra alojado el grupo hemo en color gris (Tomada y modificada de Bertrand *et al.,* 2004).

La eficiencia catalítica de la actividad de catalasa para las CP´s es en términos generales, de un orden de magnitud menor que el de las catalasas monofuncionales. Sin embargo, son consideradas más eficientes que las peroxidasas de su propia familia. También, a diferencia de las catalasas monofuncionales, las CP's son resistentes al inhibidor 3-amino,1,2,4 triazol, se inactivan con etanol-cloroformo y su actividad es sensible a altas temperaturas y a altas concentraciones de H_2O_2 (Hochman y Goldberg, 1991).

Recientemente se ha demostrado que además de su actividad bifuncional pueden poseer actividades como NADH oxidasas, pueden realizar la hidrazinólisis del ácido isonicotídico o tener actividad de isonicotinil-NAD-sintasa (Figura 3) (Singh *et al*., 2004). Aunado a su versatilidad catalítica, se han visto implicadas en otras funciones. En particular, su participación en la activación del fármaco anti-tuberculosis llamado isoniazida (Moore *et al*., 2008). También están implicadas como factores de virulencia para algunos patógenos como *Escherichia coli, Yersinia pestis y Legionella pneumophila*; por lo que, claramente la función y estructura de las CP´s tiene importantes implicaciones biomédicas (Baker *et al.,* 2004).

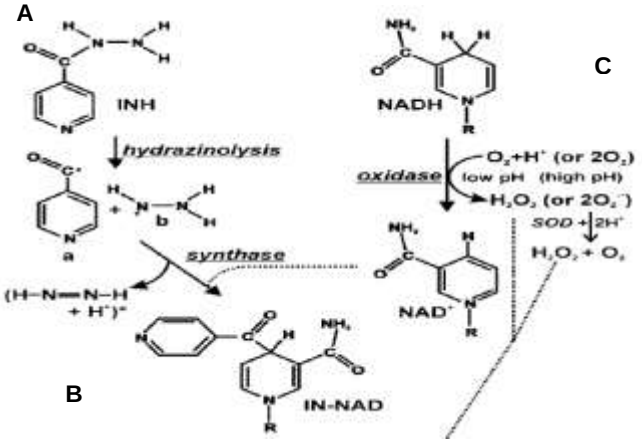


Figura 3. Relación de tres de las actividades de las CP´s. (A) Hidrazinólisis del ácido isonicotínico. **(B)** Isonicotinoyl-NAD sintasa. **(C)** Actividades de NADH oxidasa. (Tomado y modificado de Singh *et al*., 2004).

Estas enzimas bifuncionales surgieron a través de una duplicación de genes de una hidroperoxidasa ancestral. Existe una región homóloga de 230 residuos de longitud en todas las secuencias de eucariontes de la clase I de las peroxidasas que está presente dos veces en las CP´s de bacterias y arqueas. Los análisis de los grupos sugieren que una sola duplicación en tándem ocurrió en el ancestro común antes de la segregación de las líneas de arquea y de eubacteria (Zámocký *et al.,* 2009).

Centro catalítico y residuos conservados en las catalasas-peroxidasas

Las seis estructuras cristalográficas reportadas hasta la fecha de catalasas-peroxidasas en el PDB (Protein Data Bank) revelan que las cavidades del hemo proximal y distal contienen residuos altamente conservados en posiciones casi idénticas como en las peroxidasas de la clase I. En particular, las triadas His270/Trp321/Asp381 en el lado proximal e His123/Arg119/Trp122 en el lado distal (los residuos están numerados con base a la secuencia de *Synechocystis* sp*.* PCC 6803) (Figura 4A). Los residuos de estás dos triadas están conservados en el 100% de las secuencias de CP´s (Smulevich *et al*., 2006; Vega, 2007).

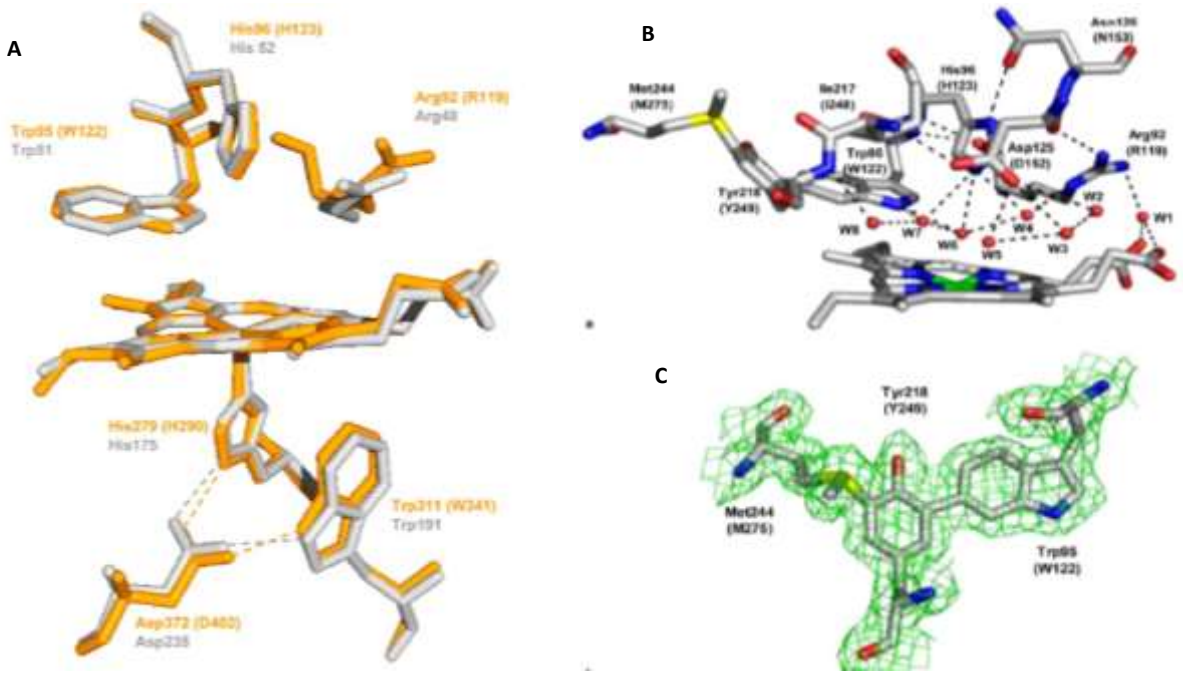


Figura 4. Entorno de la cavidad del hemo de las CP´s. (A) Superposición de los residuos del sitio activo de la CP de *Haloarcula marismortui* (amarillo), *Synechocystis* sp.PCC 6803 (numerados

entre paréntesis) y una citocromo c peroxidasa (gris). **(B)** Sitio distal del hemo, los residuos fueron numerados a partir de la secuencia de *H. marismortu,* entre paréntesis están los residuos de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y las moléculas de agua (W) **(C)** El aducto covalente de las CP´s con el mapa de densidad electrónica en verde, los residuos fueron numerados a partir de la secuencia de *H. marismortui,* entre paréntesis están los residuos de *Synechocystis.* **(**Tomada y modificada de Smulevich *et al*., 2006).

Estudios de mutagénesis han demostrado que ambas triadas están relacionadas con la reacción catalítica, además de revelar características únicas para las CP´s (Vega, 2007).

Por cristalografía de proteínas y por análisis de espectrometría de masas se ha confirmado la existencia de un inusual aducto covalente formado entre los residuosTrp122/Tyr249/Met275 del lado distal (Figura 4C). Se ha visto que el intercambio del Trp122 o la Tyr249 evita la formación del aducto covalente. Sin embargo, el intercambio de la Met275 no afecta en la formación del enlace covalente entre el Trp122 y la Tyr249 (Smulevich *et al.,* 2006; Vega, 2007). Mientras que si se muta la Met275 o la Tyr249 ocasiona que se pierda la actividad de catalasa sin afectar la actividad de peroxidasa (Zámocký *et al.,* 2001). La sustitución de la Arg119 o la His123 resulta en la reducción de la actividad de catalasa y de peroxidasa, mostrando que son residuos importantes en la heterólisis del H_2O_2. Sin embargo, la sustitución del Trp122 afecta la actividad de catalasa pues se sabe que es esencial para la reducción del compuesto I por una segunda molécula de H_2O_2, pero la actividad peroxidasa se mantiene, incluso se puede llegar a incrementar (Bertrand *et al.,* 2004; Jakopitch, 2005; Smulevich *et al*., 2006; Vega, 2007; Vega, 2011).

Otra característica típica de las CP´s es la presencia de tres asas largas llamadas LL1-LL3 (Figura 5A), dos de ellas altamente conservadas en secuencia (LL1 y LL2). Tanto LL1 como LL2 conducen el canal de acceso del H_2O_2 al grupo hemo del lado distal, ya que su sitio activo se encuentra enterrado profundamente dentro de la estructura de la enzima (Jakopitsch *et al*.,2005). El asa LL1 es particularmente interesante ya que se coloca al borde del grupo hemo entre las hélices D y E uniendo de este modo los dominios catalíticos distal y proximal

(Figura 5B), controlando también la flexibilidad característica entre la His270 proximal y el hierro del hemo. El canal de acceso se caracteriza por formar un embudo pronunciado y continúo de moléculas de agua, que en la parte más estrecha es mucho más largo y restringido que en las peroxidasas. En el lado distal se presentan dos residuos altamente conservados, el Asp152 y la Ser335, ambos están encargados de controlar el acceso al lado distal hacia los residuos His123/Arg119/Trp122 (Smulevich *et al.,* 2006).

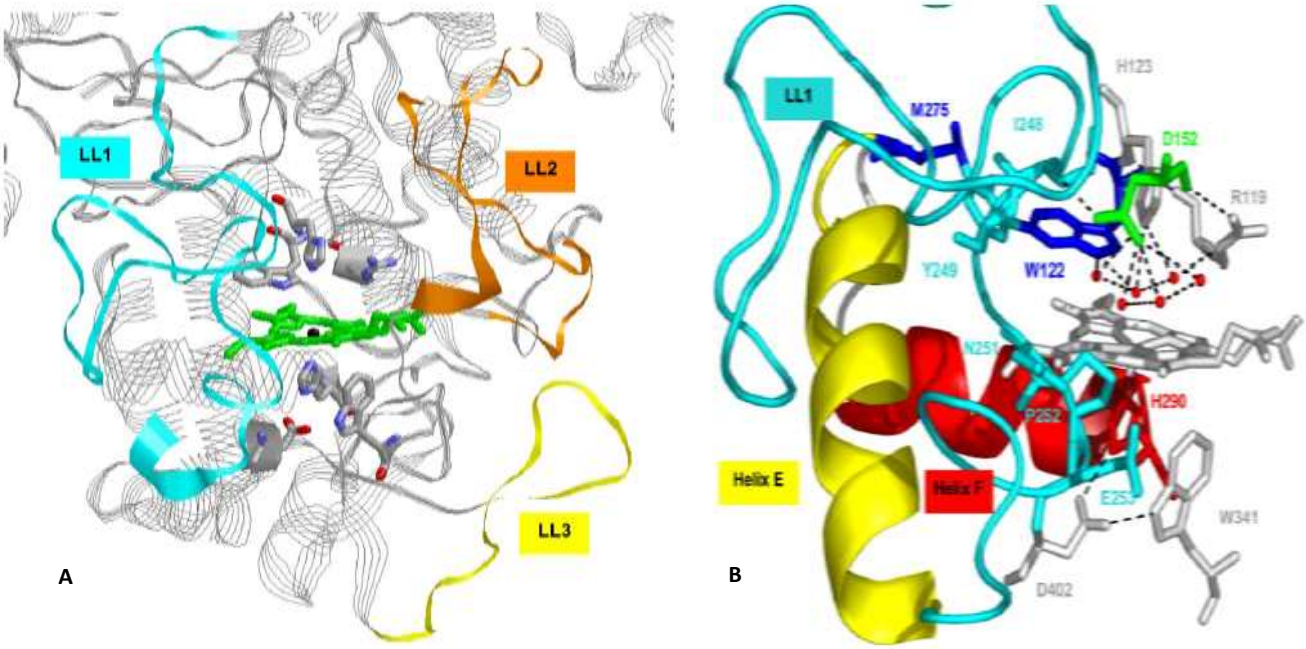


Figura 5. Estructura de las asas características de las CP´s. Diagrama estructural de la inserción de las tres asas largas en *H. marismortui* y su orientación respecto a los residuos del centro activo. **(B)** Asa LL1 conectando el sitio distal con las hélices E (amarillo) y F (rojo). Las coordenadas se tomaron de *H. marismortui,* pero los residuos fueron numerados con la secuencia de *Synechocystis* sp PCC 6803. En el lado distal los residuos forman el aducto covalente (Tomado y modificado de Smulevich *et al.*, 2006).

Mecanismo de reacción de las catalasas-peroxidasas

Las CP´s son únicas entre las hemoproteínas, porque utilizan un solo sitio activo que cataliza la descomposición del H_2O_2 a través de dos distintos mecanismos de acción. El primer paso de la reacción catalítica tanto para la actividad catalasa como para la peroxidasa es la reducción de H_2O_2 a una molécula de agua por una

escisión heterolítica del peróxido, formando un intermediario de alta valencia conocido como el compuesto I (Baker *et al.,* 2004).

En la actividad de catalasa la reducción del compuesto I se lleva a cabo mediante una transferencia de dos electrones de una segunda molécula de peróxido de hidrógeno formando dioxígeno. Mientras que la típica actividad de peroxidasa utiliza el compuesto I para oxidar un donador de electrones diferente como por ejemplo el fenol, este transfiere un electrón en dos reacciones secuenciales generando una segunda forma intermediaria de la enzima denominado compuesto II. La reacción termina cuando una segunda molécula del donador de electrones reduce al compuesto II regresando la enzima al estado inicial (Figura 6). En otras, palabras, la reacción de catalasa se encarga de dismutar el peróxido de hidrógeno, mientras que la actividad de peroxidasa se encarga de oxidar el sustrato. A pesar de eso la reacción de peroxidasa es mucho más eficiente pero irreversible en presencia de alta concentración de H_2O_2 comparada con la de catalasa, ambas reacciones se caracterizan por el retorno al estado férrico reduciendo el compuesto I generando un segundo equivalente del sustrato y H_2O (Baker *et al.,* 2004; Vega, 2011; Vidossich *et al.,* 2012).

Figura 6. **Mecanismo catalítico de las CP´s.** En la parte superior se muestra la actividad de catalasa y la formación del compuesto I, en la parte inferior se presenta la actividad de peroxidasa

y la formación del compuesto II, que después regresa al estado inicial (Tomado y modificado de Vega, 2011).

En las CP´s la reacción de peroxidasa ocurre en condiciones en las que hay baja concentración de peróxido de hidrógeno y está presente un donador de electrones apropiado (Vega, 2011).

El origen de las diferentes actividades como catalasa y peroxidasa en la enzima no se conoce, pero es probable que esté relacionado con la diferencia estructural entre el lado activo de los dos grupos hemo. La diversidad funcional mostrada por el grupo prostéico en la catálisis se atribuye comúnmente a la arquitectura de la enzima en donde se encuentra enterrado el grupo hemo (Vidossich *et al.,* 2012).

La Biología Estructural y la Cristalografía de Rayos X

En la segunda mitad del siglo XX se desarrolló la biología estructural, esta ciencia permitió revelar la estructura única de la doble hélice del DNA, explicando el mecanismo de duplicación del material genético (Watson, 1953). Una década más tarde se obtuvieron por primera vez las estructuras tridimensionales de la mioglobina (Perutz *et al.,* 1960). Estos descubrimientos fueron el origen de la determinación de estructuras tridimensionales de macromoléculas biológicas (Velásquez, 2009). Hasta la fecha se encuentran depositadas en el PDB 96,034 estructuras tridimensionales obtenidas por cristalografía de proteínas, 10,831 con RMN (Resonancia Magnética Nuclear) y 759 por microscopia electrónica entre otras (hasta abril de 2015). Por los datos anteriores nos podemos dar cuenta que la cristalografía de rayos X es, hasta el momento la técnica más exitosa para la determinación de estructuras tridimensionales de macromoléculas como las proteínas (Figura 7).

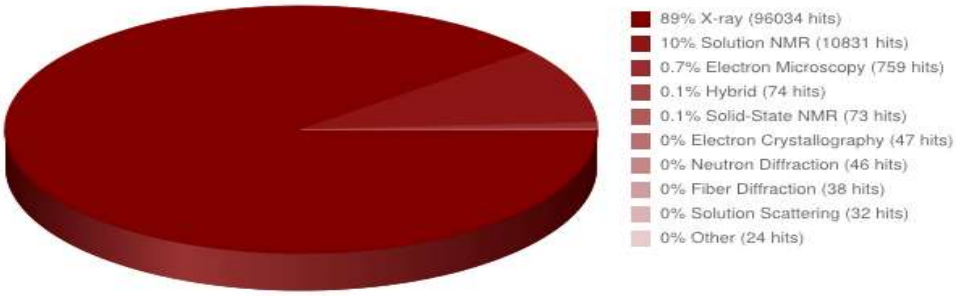


Figura 7. Estructucturas depositadas en el PDB. La gráfica muestra las técnicas por las que se han determinado las macromoléculas depositadas en el Protein Data Bank (PDB) (Tomada y modificada del PDB).

La cristalografía es la ciencia que estudia la organización de la materia en los cristales, utilizando la difracción de rayos X. La difracción de rayos X es una técnica que nos permite describir la estructura a nivel atómico de macromoléculas y su conformación estructural dentro de un cristal. Para determinar una estructura cristalográfica se requiere de un conjunto de procesos como: la purificación de la macromolécula, la cristalización, la colecta de datos, el análisis de las reflexiones y el cálculo de las fases, el refinamiento y el análisis de la estructura.

La aplicación de dispersión dinámica de luz en la cristalización de proteínas

La implementación de técnicas biofísicas en la cristalización de proteínas ha permitido estudiar varios aspectos del crecimiento de un cristal (Wilson, 2003). La técnica de dispersión dinámica de luz puede identificar parámetros fisicoquímicos que mejoren y faciliten la cristalización, como la determinación del pH óptimo, la fuerza iónica y el uso de aditivos que promuevan la estabilidad y la solubilidad de la proteína (McPherson y Cudney, 2014). Así como también determinar el tamaño de las macromoléculas. Específicamente han tenido aplicaciones en ensayos de pre-nucleación y post-nucleación (Wilson, 2003). Obteniendo así, una manera de optimizar las pruebas de cristalización (Ferré-D Amarré *et al*., 1994; Lorber *et al*., 2012; Cuadros-Moreno *et al*., 2014).

El tamaño de las proteínas en solución se calcula a partir del radio

hidrodinámico calculado con un equipo de DLS (Proteau *et al.,* 2010). El radio hidrodinámico o radio de Stokes-Einstein está definido como el radio de una esfera rígida hipotética, cuya velocidad de difusión es la misma que la media de las velocidades de difusión de sus diferentes orientaciones espaciales.

En la práctica, no es frecuente que las macromoléculas sean rígidas y esféricas, si no, que son especies dinámicas, que pueden interactuar con el disolvente en el que están disueltas. Por tal motivo, el radio hidrodinámico calculado está relacionado con el tamaño aparente de la macromolécula, tomando en cuenta los procesos de atracción y asociación con moléculas del disolvente, y de ahí su nombre, "radio hidrodinámico" (De los Ríos *et al,.* 2009).

La cristalización de proteínas

La cristalización de proteínas fue descubierta hace aproximadamente 150 años pero no fue hasta el siglo XIX que se desarrolló como una poderosa herramienta de purificación demostrando la pureza química de los compuestos. En 1930 los cristales de proteína comenzaron a tomar un papel muy importante como consecuencia a la llegada de la cristalografía de rayos X aplicada a macromoléculas biológicas (McPherson, 2004).

La palabra “cristal” proviene del griego “*krustallos”* que significa “solidificado por enfriamiento”. Los griegos pensaban que el cuarzo era formado a través de la transformación del hielo por enfriamiento (Ducuix y Giegé, 1992).

Podemos definir a un cristal como aquellos materiales sólidos cuyos elementos constitutivos (átomos, iones o moléculas,) se repiten de manera ordenada y paralela y cuya distribución en el espacio muestra ciertas relaciones de simetría (Figura 8). Así, la característica del medio cristalino es el ser periódico; es decir, que a lo largo de cualquier dirección la materia que lo forma se halla a distancias específicas y paralelamente orientada. Por lo tanto, el cristal está formado por la repetición monótona de agrupaciones atómicas paralelas entre sí y a distancias repetitivas especificas formando una red cristalina. En esta red existe

una porción del espacio cristalino, denominado celda unitaria. La celda unitaria es la unidad mínima en un cristal (Rudiño-Piñera, 2010).

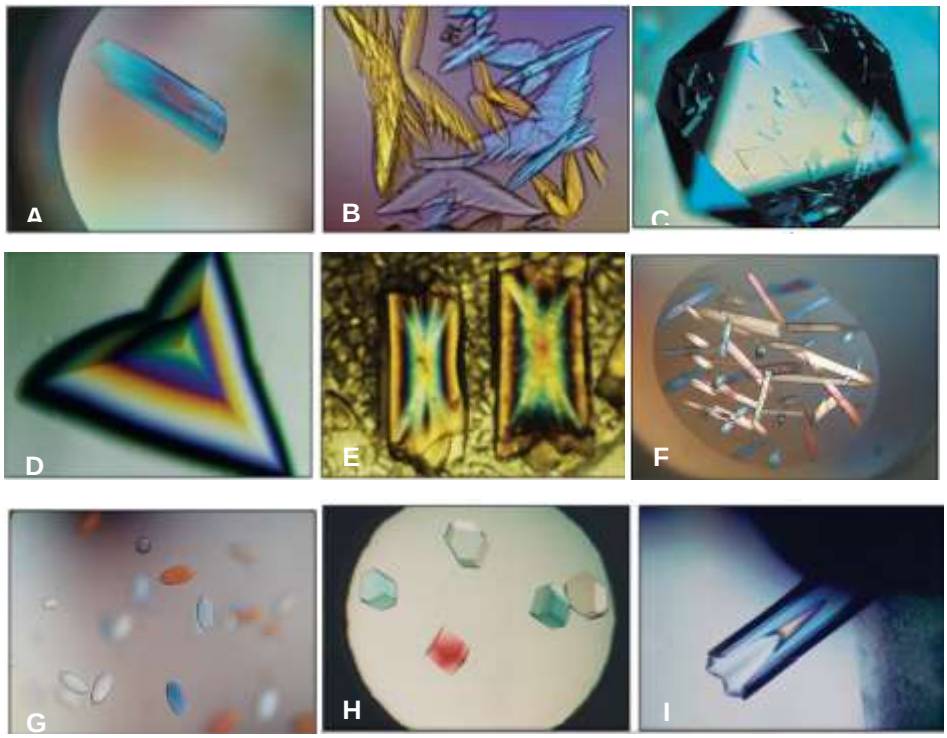


Figura 8. Cristales de proteína. Microfotografías de cristales de proteínas en crecimiento. **(A, B, F y G)** corresponden a cristales obtenidos con un kit comercial. **(D, E y C)** son cristales de virus del mosaico del tabaco. **(H)** Cristales del virus *Desmodium* e **(I)** son cristales de canavalina (tomado y modificado de McPherson y Gavira, 2014).

La cristalización es uno de los cuellos de botella en el proceso de la determinación de estructuras cristalográficas. Por lo anterior, se han implementado diversas variaciones en el proceso, con el fin de explorar el mayor universo de condiciones de cristalización; esto se logra variando las concentraciones de proteína y del agente precipitante, así como variando la temperatura y el pH, principalmente (Campos, 2010). También, el estado de la macromolécula, la presencia de iones metálicos, inhibidores, cofactores y otras moléculas pequeñas pueden alterar la estabilidad en la estructura del cristal.

Las técnicas que se emplean con mayor frecuencia son la difusión de vapor, la diálisis, el “batch” y la difusión líquido-líquido (Figura 9). Para cristalizar se forman gotas constituidas por las soluciones con la proteína y las soluciones

precipitantes a diferentes concentraciones permitiendo la generación de núcleos (McPherson, 2004).

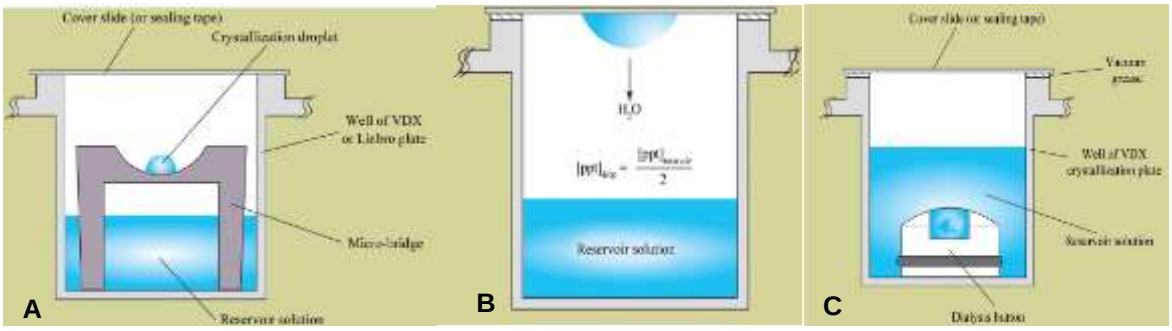


Figura 9. **Técnicas de cristalización de proteínas**. **(A)** Ilustración del método de difusión de vapor de la gota sentada. **(B)** Gota colgante. **(C)** Método de microdiálisis. (Tomada y modificada de McPherson, 2004).

En años recientes la implementación de kits y robots de cristalización han vuelto mucho más eficiente el proceso de la cristalización.

Antecedentes

En 1979, Claiborne y Fridovich reportaron el aislamiento de una enzima con alta actividad de catalasa además de la actividad de una peroxidasa clásica. La co-purificación de las dos actividades en una sola enzima de *E. coli* (HPI) fue reportada una década más tarde en 1988. La secuencia del gen KatG mostró una estrecha relación con las peroxidasas de las plantas (Njuma *et al.,* 2014).

La primera estructura cristalográfica de CP´s reportada fue la de la arquea *Haloarcula marismortui* a 2 Å de resolución (Yamada *et al.,* 2002). En 1987 se intentó determinar la estructura de la CP de *E. coli,* pero solo se logró obtener el dominio C-terminal con una resolución de 2.3 Å (Díaz *et al.,* 2012). El trabajo con las catalasas-peroxidasas continúa y hasta la fecha se encuentran depositadas cuatro estructuras cristalográficas más de CP´s en el PDB; la de *Burkholderia pseudomallei* a 1.7 Å (Carpena *et al.,* 2003), la de *Sinechococcus elongatus* a 2.12 Å (Wada *et al.,* 2002), la de *Mycobacterium tuberculosis* a 2 Å (Bertrand *et al.,* 2004) y la de *Magnaporthe grisea* a 1.55 Å (Zámocký *et al.,* 2012) (Figura 10). Las estructuras de CP's revelan que los sitios proximal y distal donde se encuentra contenido el hemo presentan los residuos de aminoácidos conservados casi en idénticas posiciones.

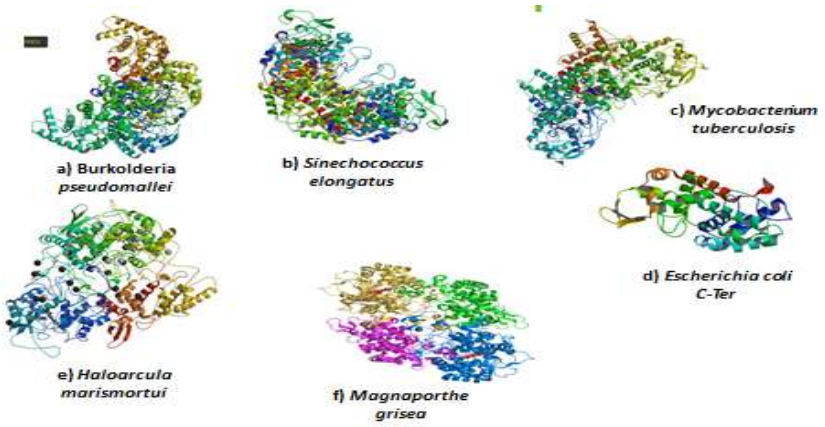


Figura 10. Estructuras cristalográficas de las CP´s depositadas en el PDB. (A) CP de *Burkholderia pseudomallei* a 1.7 Å. **(B)** CP de *Sinechococcus elongatus* a 2.12 Å. **(C)** CP de *Mycobacterium tuberculosis* a 2 Å. **(D)** Dominio C-terminal de la enzima de *Escherichia coli.* ***(E)*** CP

de *Haloarcula marismortui* a 2 Å y **(F)** CP de *Magnaporthe grisea* a 1.55 Å (Estructuras tomadas y modificadas del PDB).

La catalasa-peroxidasa de *Neurospora crassa* (CAT-2)

Neurospora crassa cuenta con tres catalasas monofuncionales CAT-1, CAT-3 y CAT-4; una CP denominada CAT-2, cinco peroxidasas y cuatro peroxirredoxinas, todas asociadas con células que no están en crecimiento y que se encuentran particularmente en esporas asexuales (Domínguez *et al.,* 2010).

El gen de la CAT-2 se localiza en el cromosoma VII, no tiene intrones y codifica para 753 residuos. La enzima presenta una masa molecular de 83.4 kDa por subunidad más el grupo hemo y es homodimérica. La secuencia de aminoácidos de la CAT-2 indica que al igual que las otras CP´s conserva los residuos de aminoácidos esenciales del sitio activo que forman el aducto covalente Trp122/Tyr249/Met275 en el lado proximal y también presenta las dos asas que restringen el canal de acceso al sitio activo de las CP´s en la superficie del dominio N-terminal (Figura 11). La diferencia estructural más notable de la CAT-2 con las otras CP´s es la presencia de 26 residuos más en las hélices D y E que presumiblemente se encuentran en el asa LL1. En cuanto a su actividad catalítica, la CAT-2 es una enzima bifuncional que puede reducir el peróxido de hidrógeno y otros peróxidos orgánicos como el ter-butilhidroperóxido usando como agente reductor la o-dianisidina, el guacayacol, la diaminobencidina, el ácido 2,2´-azino-bis y el ascorbato; presenta un pH óptimo más ácido para la actividad de catalasa comparada con otras CP´s (Peraza, 2005).

La CAT-2 es una enzima citosólica. A pesar de que se induce con compuestos que metabolizan los peroxisomas, esta no se encuentra en los orgánulos como los peroxisomas o los glioxisomas, y tampoco tiene las secuencias típicas para su localización peroxisomal (Peraza, 2005).

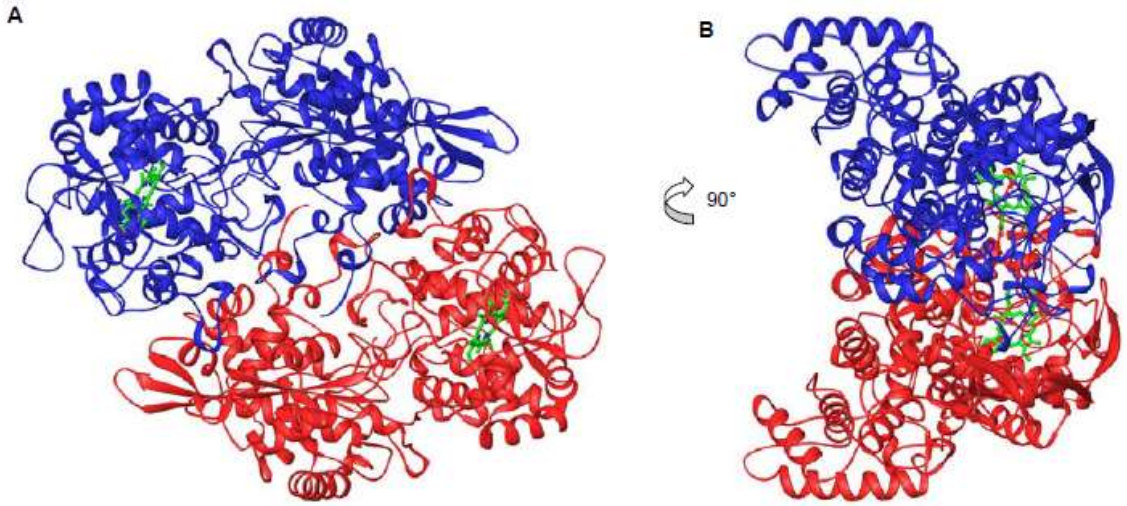


Figura 11. Modelo de la CAT-2. La figura muestra un modelo de la CAT-2 generado por homología de secuencia con la estructura cristalográfica de *B. pseudomallei* que tiene 60% de identidad de secuencia con la CAT-2. **(A)** Representación del homodímero y los grupos hemo. **(B)** Estructura del homodímero rotada 90° en el plano de Y. (Tomado y modificado de Peraza, 2011).

Desde hace aproximadamente seis años se ha estudiado la CAT-2 en el laboratorio del Dr. Wilhelm Hansberg en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las investigaciones se han centrado en entender la función de la enzima, purificar la enzima nativa y también la recombinante, analizar el grupo hemo, caracterizarla cinéticamente, así como su estudio genético y también con bioinformática.

Anteriormente se había producido la enzima recombinante utilizando un vector de expresión para producir la enzima con una etiqueta de seis histidinas, lo anterior, para facilitar su purificación (Vega, 2007). Aunque hasta la fecha, no se ha logrado conseguir la enzima lo suficientemente pura para obtener cristales que permitan determinar su estructura. Por lo que el principal interés de este trabajo es el obtener mejores cristales de la catalasa-peroxidasa de *N. crassa.*

Planteamiento del Problema

La catalasa-peroxidasa (CAT-2) de *N. crassa* como su nombre lo indica es una enzima bifuncional que presenta actividad de catalasa y de peroxidasa con una alta eficiencia. Actualmente sólo se encuentra determinada una estructura cristalográfica de CP's para eucariontes, la de *Magnaporthe grisea* (KatG) que se ha reportado que se encuentra en forma extracelular, mientras que la CAT-2 se presenta de manera intracelular. El tener otra estructura de un organismo eucarionte nos permitiría conocer muchos más detalles sobre el mecanismo de acción y las posibles modificaciones que se pudieran llegar a presentar en el grupo hemo, comprobar la presencia del característico aducto covalente en las CP's. El aducto covalente está compuesto por un Triptofano, una Tirosina y una Metionina, esta triada está relacionada con la actividad catalítica de la enzima pero aún no está comprobada su presencia estructural en la CAT-2. Además de tratar de entender la función de unas asas presentes en el dominio N-terminal del sitio de acceso del sustrato al centro catalítico. Sin olvidar que hasta la fecha no se ha cristalizado con éxito ni determinado la estructura cristalográfica de la CAT-2.

Hipótesis

La generación de una construcción donde el gen de la CAT-2 esté fusionado al de una inteína, junto con la implementación de un nuevo protocolo de purificación permitirán obtener mejores condiciones de cristalización para la CAT-2 de *N. crassa*.

Objetivo General

- Cristalizar la catalasa-peroxidasa (CAT-2) de *Neurospora crassa.*

Objetivos Específicos

1. Optimizar la purificación de la CAT-2.
2. Analizar la pureza y homogeneidad de la enzima por isoelectroenfoque (estimar su punto isoeléctrico) y DLS (dispersión dinámica de luz).
3. Obtener condiciones de cristalización para la CAT-2.
4. Optimizar las condiciones de cristalización obtenidas para la CAT-2.
5. Difractar con rayos X los cristales obtenidos.

Materiales y métodos

Sobreexpresión y purificación de la CAT-2

La clonación y la purificación por afinidad de la CAT-2 fueron realizadas por la Maestra en Ciencias Vanessa Vega García, en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. El gen de la CAT-2 se clonó en el vector PTY21 siguiendo el protocolo del kit “IMPACT” (Intein Mediated Purification with an Affinity Chain-binding Tag. Protein purification system). El vector se utilizó para transformar las células ER2566 de *E. coli*. Este sistema de expresión permite la fusión de la inteína-CBD en el dominio N-terminal de la CAT-2, facilitando la purificación de la enzima con una columna de afinidad de quitina.

Cromatografía de Intercambio aniónico

Antes de comenzar la cromatografía, la CAT-2 se dializó en 1 L de amortiguador Tris- HCl 20 mM, pH 7.5 por 24 horas. Después, la enzima se centrifugó a 13,000 rpm durante 8 minutos y se separó del precipitado. El sobrenadante y el precipitado se analizaron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%.

Para purificar un poco más la CAT-2 recombinante se utilizó una columna de intercambio aniónico (Q-Shepharose de GE Healthcare), previamente equilibrada con amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 utilizando un cromatógrafo Bio-Rad (“Estándar “Biologic Low-Pressure System”). Después, la columna se lavó con cinco volúmenes de columna del amortiguador y la CAT-2 se eluyó con un gradiente lineal de 0-100% de NaCl 1 M en amortiguador de Tris. Se colectaron fracciones de 0.5 mL. Las fracciones correspondientes al pico de la enzima se analizaron en un SDS-PAGE al 10% y las que contenían la CAT-2 se concentraron por centrifugación utilizando filtros de Millipore (Amicon Ultracel®-30K, Millipore).

Cromatografía de exclusión molecular

La CAT-2 concentrada (250 µL) se inyectó a una columna de exclusión molecular (Superdex 200 HR 10-30 de GE) equilibrada con amortiguador de fosfatos (Fosfato dibásico de sodio/fosfato monobásico de potasio) 50 mM, pH 7.5. La CAT-2 se eluyó con una velocidad de flujo de 0.3 mL/min. Para este paso de purificación se utilizó un equipo ÄKTA PRIME de GE y se colectaron fracciones de 0.5 mL.

Después de cada cromatografía se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE) al 10 % para analizar la pureza de las muestras. En todos los casos los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. La proteína fue cuantificada en un equipo Nanodrop por su absorbancia a 280 nm.

Determinación del punto isoeléctrico de la CAT-2

El punto isoeléctrico (pI) de la CAT-2 se determinó utilizando un gel de gradiente de pH previamente hidratado “phastgel”, que cubre un intervalo de pH de 3-9. El gel se corrió en un equipo Phastsystem y se tiñó con azul de Coomassie.

Análisis de la CAT-2 por dispersión dinámica de luz (DLS)

Para esta técnica se utilizó un equipo DLS (Dispersión Dinámica de Luz por sus siglas en inglés), este irradia una solución de moléculas de proteínas con un haz monocromático de luz y analiza las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada en función del tiempo y la temperatura.

Las muestras de la CAT-2 se colocaron en una celda de un 1 mL a una concentración de 1 mg/mL. Se utilizaron los siguientes amortiguadores para cada una de las muestras de enzima: Arginina 50 mM, pH 7.5, amortiguador de fosfatos (Fosfato dibásico de sodio/fosfato monobásico de potasio) 50 mM, pH 7.5 y Tris HCl 20 mM, pH 7.5, que son los amortiguadores que se utilizaron en las pruebas de cristalización. Antes del análisis con DLS cada muestra fue filtrada con filtros MILLEX VV de 0.1 µm de Millipore.

Cristalización de la CAT-2

Para las pruebas de cristalización se utilizó el método de “microbatch”, que es un método de cristalización sencillo. El método se realizó manualmente y consistió en combinar el agente precipitante (1ul) y la enzima a cristalizar (1 ul) en una gota, a una concentración tal que la sobresaturación se alcanza instantáneamente. Posteriormente la gota es sumergida en un aceite inerte (parafina 10 µL) para evitar la evaporación.

También se utilizó el método de difusión de vapor (gota colgante y gota sentada), que es el método más difundido entre la comunidad cristalográfica. El método consiste en colocar una gota de la macromolécula (200 µL) con una gota del agente precipitante (200 µL), los cuales se ponen a equilibrar contra un reservorio, que contiene solo el agente precipitante (40 µL). La placa se sella herméticamente con una cubierta de plástico. La nucleación ocurre cuando la concentración de proteína incrementa por la reducción del volumen causado por el equilibrio de vapor de agua de la gota que contiene la proteína a una solución higroscópica (Rudiño-Piñera, 2010; Rojas, 2015. Resultados sin publicar).

Las pruebas de difusión de vapor se realizaron con el robot de cristalización “Mosquito LCP” en placas de 96 pozos y en las de “microbatch” se utilizaron placas de 72 pozos. En las pruebas se utilizaron siete kits de cristalización de la marca “Hampton Research” (“Crystal Screen 1 y 2, Index 1 y 2, Crystal Screen Lite, PEG Ion y Crystal Screen Cryo”) y cuatro de la marca “Jena Bioscience”, (“Wizard 1-4”) con una concentración de CAT-2 de 15 mg/mL. La mayoría de las placas de cristalización se incubaron a 18°C y algunas a 4°C.

Optimización de la cristalización de la CAT-2

Algunas de las condiciones de cristalización encontradas se optimizaron y escalaron diseñando diferentes matrices, donde se variaron las concentraciones del agente precipitante, del amortiguador y de las sales así como también se aumentó el volumen de las gotas; manteniendo constantes la temperatura y la concentración de la enzima.

Las matrices que se utilizaron fueron las siguientes:

La primera condición de cristalización que se optimizó fue la gota E1, del kit “Crystal Screen Lite” que contenía: acetato de sodio 0.1 M, pH 4.6, cloruro de calcio 0.02 M y MPD 15%, con una concentración de CAT-2 de 15 mg/mL. La enzima estaba en un amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 y a una temperatura de 18°C (Tabla 1).

Tabla 1. Matriz de optimización E1. La Tabla muestra la variación de las concentraciones de la solución madre para la optimización de la cristalización de la condición E1 del kit “Crystal Screen Lite”.

Pozo	Acetato de sodio, pH 4.6 (M)	$CaCl_2$ (M)	MPD (%)
A1	0.1	0.018	9
A2	0.1	0.018	10
A3	0.1	0.018	11
A4	0.1	0.018	12
A5	0.1	0.018	13
A6	0.1	0.018	14
A7	0.1	0.018	15
A8	0.1	0.018	16
A9	0.1	0.018	17
A10	0.1	0.018	18
A11	0.1	0.018	19
A12	0.1	0.018	20
B1	0.1	0.020	9
B2	0.1	0.020	10
B3	0.1	0.020	11
B4	0.1	0.020	12
B5	0.1	0.020	13
B6	0.1	0.020	14
B7	0.1	0.020	15
B8	0.1	0.020	16
B9	0.1	0.020	17
B10	0.1	0.020	18
B11	0.1	0.020	19
B12	0.1	0.020	20

C1	0.1	0.022	9
C2	0.1	0.022	10
C3	0.1	0.022	11
C4	0.1	0.022	12
C5	0.1	0.022	13
C6	0.1	0.022	14
C7	0.1	0.022	15
C8	0.1	0.022	16
C9	0.1	0.022	17
C10	0.1	0.022	18
C11	0.1	0.022	19
C12	0.1	0.022	20

La segunda condición de cristalización que se optimizó fue la gota A12 del Kit “Crystal Screen 1” que contenía: cloruro de magnesio 0.2 M, Hepes-sodio 0.1 M, pH 7.5 e isopropanol 30%. El amortiguador de la muestra era Arginina 50 mM, pH 7.5 con una concentración de CAT-2 de 15 mg/mL a 18 °C. La matriz de optimización que se utilizó está en el Tabla 2.

Tabla 2. Matriz de optimización A12. La tabla muestra la variación de las concentraciones de la solución madre para la optimización de la cristalización de la condición A12 del kit “Crystal Screen 1”

Pozo	Isopropanol (%)	Cloruro de magnesio (M)	Hepes-sodio pH 7.5 (M)
C1	28	0.175	0.1
C2	30	0.175	0.1
C3	32	0.175	0.1
C4	34	0.175	0.1
C5	28	0.2	0.1
C6	30	0.2	0.1
C7	32	0.2	0.1
C8	34	0.2	0.1
C9	28	0.225	0.1
C10	30	0.225	0.1
C11	32	0.225	0.1

C12	34	0.225	0.1

La tercera condición de cristalización que se optimizó fue la gota D10 del Kit "Wizard 1" y contenía: PEG 8,000 10%, imidazol 0.1 M, pH 8 y acetato de calcio 200 mM. La enzima estaba a una concentración de 15 mg/mL en amortiguador de fosfatos (Fosfato dibásico de sodio/fosfato monobásico de potasio) pH 6.2. La placa se incubó a 18° C y se utilizó la siguiente matriz de optimización (Tabla 3).

Tabla 3. Matriz de optimización D10. La tabla muestra la variación de las concentraciones de la solución madre para las pruebas de cristalización de la condición D10 del kit "Wizard 1"

Pozo	PEG 8,000 (%)	Acetato de calcio (M)	Imidazol, pH 8 (M)
A1	8	0.175	0.1
A2	10	0.175	0.1
A3	12	0.175	0.1
A4	14	0.175	0.1
A5	8	0.2	0.1
A6	10	0.2	0.1
A7	12	0.2	0.1
A8	14	0.2	0.1
A9	8	0.225	0.1
A10	10	0.225	0.1
A11	12	0.225	0.1
A12	14	0.225	0.1

La cuarta condición de cristalización que se optimizó fue la gota F2 del Kit "Wizard 2" y contenía: PEG 1,000 20%, amortiguador de fosfatos 100 mM (Fosfato dibásico de sodio/fosfato monobásico de potasio), pH 6.2 y cloruro de sodio 200 mM. La enzima estaba en amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 a una concentración de 15 mg/mL en 18°C, para esta optimización se utilizó la siguiente matriz (Tabla 4).

Tabla 4. Matriz de optimización F2. La tabla muestra la variación de las concentraciones de la solución madre para las pruebas de cristalización de la condición F2 del kit "Wizard 2"

Pozo	PEG 1,000 (%)	Cloruro de sodio (M)	Fosfatos pH 6.2 (M)
F1	18	0.175	0.1
F2	20	0.175	0.1
F3	22	0.175	0.1
F4	24	0.175	0.1
F5	18	0.2	0.1
F6	20	0.2	0.1
F7	22	0.2	0.1
F8	24	0.2	0.1
F9	18	0.225	0.1
F10	20	0.225	0.1
F11	22	0.225	0.1
F12	24	0.225	0.1

La quinta condición de cristalización que se optimizó fue la gota D3 del Kit "Crystal Screen Lite" y contenía Hepes 100 mM, pH 7.5, PEG 400 2%, sulfato de amonio 1 M. La enzima estaba en un amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 a una concentración de 15 mg/mL en 18 °C. La matriz de optimización fue la siguiente (Tabla 5).

Tabla 5. Matriz de optimización D3. La tabla muestra la variación de las concentraciones de la solución madre para la optimización de la condición D3 del kit "Crystal Screen Lite"

Pozo	PEG 400 (%)	Sulfato de amonio (M)	Hepes-sodio pH 7.5 (M)
E1	1	0.6	0.1
E2	1	0.8	0.1
E3	1	1	0.1
E4	1	1.2	0.1
E5	2	0.6	0.1
E6	2	0.8	0.1
E7	2	1	0.1
E8	2	1.2	0.1
E9	3	0.6	0.1
E10	3	0.8	0.1

E11	3	1	0.1
E12	3	1.2	0.1

Difracción de rayos X de los cristales de CAT-2

Se seleccionaron nueve cristales que fueron sometidos a la difracción de rayos X con el fin de evaluar su calidad, específicamente que fueran de la enzima y también conocer la resolución a la cual difractaban. La difracción se realizó en dos líneas de luz sincrotrón. La primera fue la línea X6A en Brookhaven BNL (Brookhaven National Laboratory, por sus siglas en inglés) y la segunda fue la línea 11-1 del sincrotrón de Stanford, SSRL (Stanford Synchrotron Radiation Lightsource, por sus siglas en inglés).

Análisis de la secuencia y generación de un modelo de la CAT-2

Se realizó un análisis de secuencia de la CAT-2 utilizando los siguientes programas:

BioEdit XtalPred

ProtParam BLAST

Lo anterior con el fin de comprender aspectos importantes de la CAT-2 como algunas interacciones estructurales, conocer la identidad de la secuencia con otras CP´s, realizar alineamientos de secuencia y para la determinación de algunos parámetros fisicoquímicos.

También se utilizó el programa SWISS MODEL de ExPASy, donde fue generado un modelo de la CAT-2 por homología de secuencia utilizando principalmente la estructura de la CP de *M. grisea*. Lo anterior, con el fin de visualizar un poco más el modelo tridimensional de la enzima.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Purificación de la CAT-2

El proceso de purificación de la CAT-2 se realizó en dos pasos, el primero fue realizado por la M. en C. Vanessa Vega García en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Para el primer paso se siguió la metodología sugerida en el kit “IMPACT” de “NEW ENGLAND BIOLABS”, ya que al expresar la enzima fusionada a una inteína ubicada en el dominio N-terminal se reducían los pasos de purificación a una sola cromatografía de afinidad y en principio, también permitiría obtener una muestra con alta pureza. Cada inteína contiene un dominio de unión a quitina (CBD). Así, la CAT-2 se purificó utilizando una columna de quitina.

Posteriormente a la cromatografía de afinidad se realizó un análisis electroforético donde se observa la presencia de contaminantes en la muestra y una banda que se encuentra mucho más enriquecida, con una masa molecular de 83.4 kDa, que corresponde a la masa molecular del monómero de la CAT-2 (Figura 12).

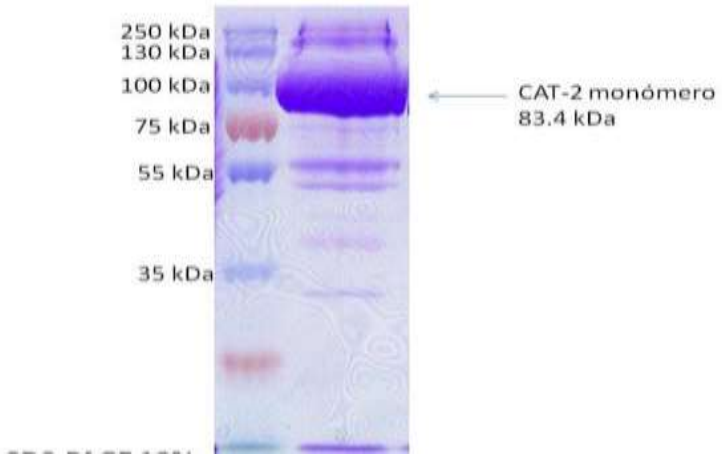


Figura 12. SDS-PAGE de la CAT-2. El gel está al 10% de concentración y en él se observa una banda enriquecida de 83.4 kDa que corresponde a la CAT-2. El gel representa el primer paso de

purificación de la CAT-2 que es una cromatografía de afinidad con una columna de quitina. (SDS-PAGE realizado por Vanessa Vega).

Cromatografía de Intercambio Aniónico

Un vez que se nos entregó el primer lote de CAT-2 (Lote A), se utilizó una columna de intercambio aniónico. Previamente a la cromatografía se conocía el punto isoeléctrico teórico de la CAT-2 (5.52) así que se utilizó una columna Q-Shepharose de GE Healthcare. La enzima eluyó al 63% del gradiente lineal de 0-100% de cloruro de sodio 1 M. Las fracciones colectadas que contenían la CAT-2 iban de la 19 a la 26 como se puede observar en el cromatograma (Figura 13). También, con el fin de analizar las fracciones se realizó un SDS-PAGE al 10%, donde se observaron los siguientes resultados:

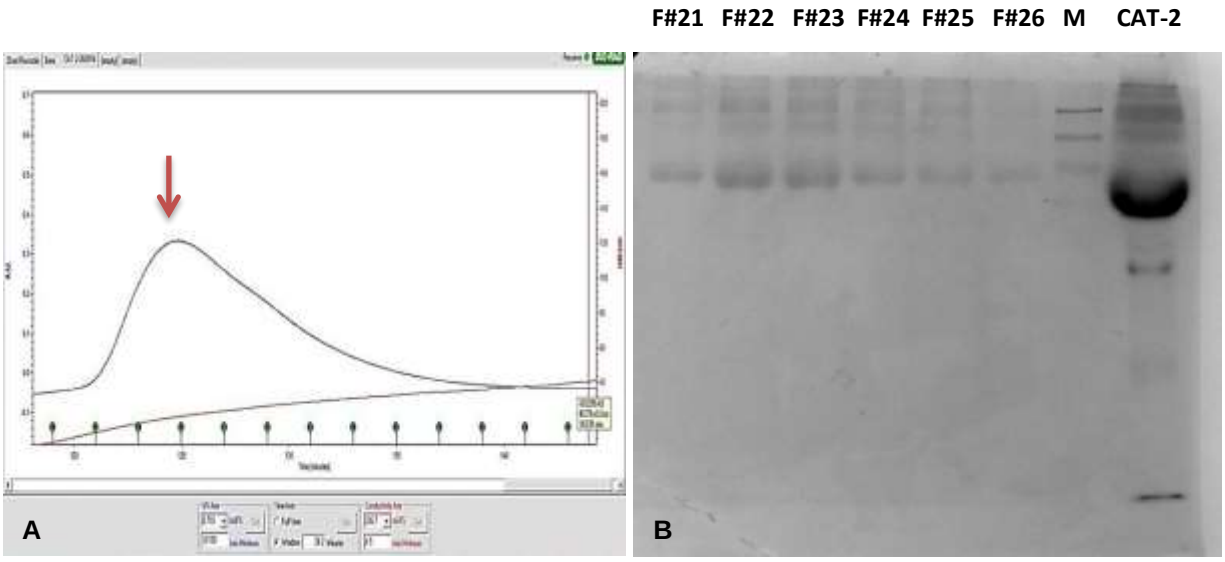


Figura 13. Cromatografía de intercambio aniónico. (A). Cromatograma del primer lote de CAT-2. Aquí se utilizó la columna de intercambio aniónico Q-sefarosa y en la figura se muestra la elusión de la enzima. **(B)** SDS-PAGE al 10% de las fracciones colectadas de la cromatografía. En el gel se corrieron muestras de las fracciones 21 a 26. El marcador de masa molecular (M) y una muestra de la CAT-2 antes de la cromatografía se utilizaron como controles.

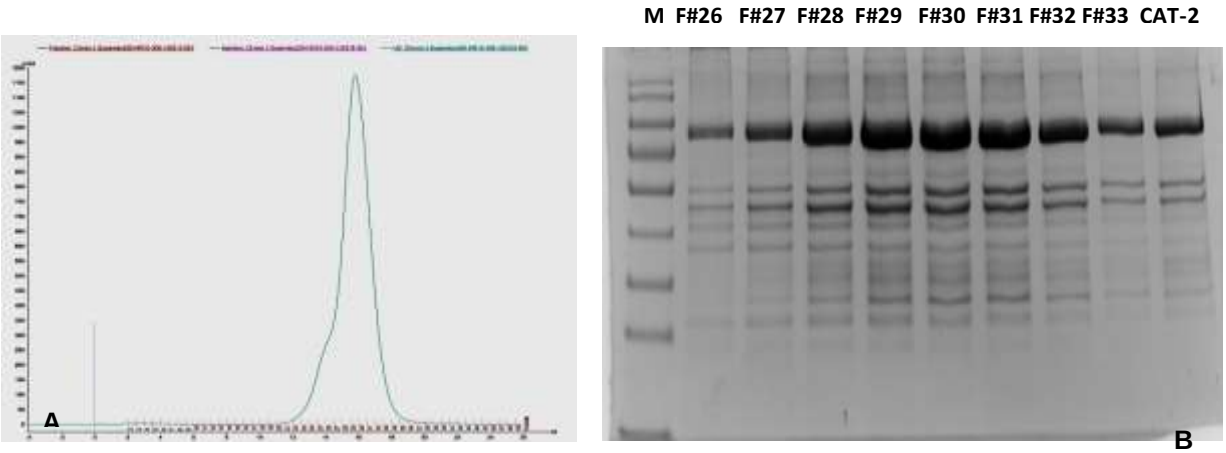
Como se puede observar en las imágenes del cromatograma y el gel, la pureza de la CAT-2 hasta este paso no es la más adecuada, ya que, no se observa en el cromatograma un solo pico simétrico, lo que refleja la pureza de la

enzima. Además en el SDS-PAGE se observa la presencia de una banda enriquecida que representa la masa molecular del monómero de la CAT-2 (83.4 kDa) pero también otras bandas de algunos contaminantes.

La pureza de la proteína es un parámetro crítico en el proceso de cristalización, pero no es un requerimiento absoluto, ya que la formación de núcleos cristalinos y la cristalogénesis se pueden obtener a partir de algunas mezclas de proteínas. Aunque lo más recomendable es que la proteína presente una pureza mayor al 95% para conseguir mejores resultados (Ducuix y Giegé, 1992).

Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular se realizó con un lote distinto de la enzima (Lote C). Para este paso de purificación se utilizó una columna Superdex 200 HR 10-30 de GE. Se eligió esta columna con el fin de remover las impurezas de la muestra e intentar obtener la CAT-2 mucho más pura. La enzima se encuentra presente entre las fracciones 26 a 33. En este paso de purificación se obtuvo el cromatograma mostrado en la Figura 14A donde se observa un pico bastante simétrico. Aunque en el SDS-PAGE al 10% se observa que la pureza de la CAT-2 a pesar de haber utilizado una columna de exclusión molecular, no mejora (Figura 14B).



Cromatografía de exclusión molecular. (A) Cromatograma de exclusión molecular. Se muestran las

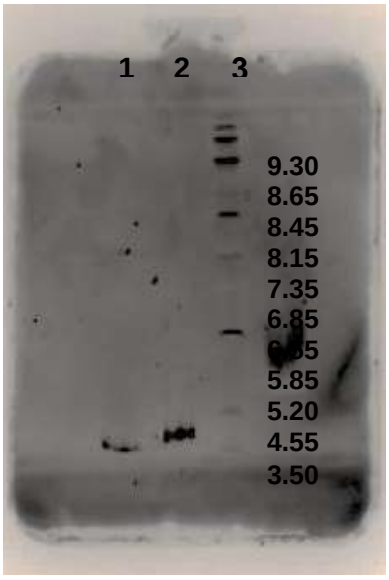
fracciones que contienen la CAT-2**. (B)** SDS-PAGE al 10% de las fracciones de la cromatografía. Se observa que la CAT-2 se encuentra enriquecida.

En la tabla 6 se muestra la purificación y cristalización de cada uno de los lotes de enzima con los que se trabajó.

Tabla 6. Tabla comparativa de los tres lotes de la CAT-2. En la tabla se observan las diferentes pruebas a las que fueron sometidos los lotes de CAT-2 que se recibieron con el fin de garantizar mejores resultados.

Nombre del lote	Método de Purificación	Pruebas de Cristalización	Optimización
Lote A	Cromatografía de afinidad Cromatografía de Intercambio Aniónico	Gota Colgante "Mosquito LCP" "batch"	Si
Lote B	Cromatografía de afinidad	Gota Sentada "Mosquito LCP"	No
Lote C	Cromatografía de afinidad Cromatografía de Exclusión Molecular	Gota Colgante "Mosquito LCP" "batch"	Si

Determinación del punto isoeléctrico de la CAT-2



Se realizó un estimado teórico del pI (punto isoeléctrico) de la CAT-2, analizando la secuencia con el programa ProtParam de ExPASy, donde se obtuvo un valor de 5.9.

Para corroborar este dato se determinó experimentalmente el pI de la CAT-2 por isoelectroenfoque utilizando un equipo Phastsystem y un gel pre-hidratado con un gradiente de pH de 3-9. Para la banda correspondiente a la CAT-2 se determinó que su pI es de 5 (Figura 15).

Figura 15. Punto isoeléctrico de la CAT-2. En los carriles 1 y 2 del gel de isoelectroenfoque se encuentra la muestra de la CAT-2, mientras en el carril 3 se observa el marcador de pH**.**

La muestra de CAT-2 estaba a una concentración de 1 mg/mL en amortiguador de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5.

Análisis de la CAT-2 por dispersión dinámica de luz (DLS)

El análisis de DLS de la CAT-2 se empleó para caracterizar la homogeneidad, estabilidad conformacional, las propiedades térmicas y así como también para evaluar la pureza de la enzima.

En primer lugar se realizó un barrido de temperaturas de la CAT-2 en un intervalo de 7 a 40°C con el amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 (Figura 16). Aquí la enzima mostró un comportamiento estable y una distribución homogénea de las partículas en solución, ya que en la muestra solo había partículas de un mismo tamaño. También se puede notar como este amortiguador le confiere una gran estabilidad a la enzima, lo anterior se puede apreciar en la Figura 16, donde se observa que aunque se llegan a presentar estados de agregación en algunas de las temperaturas analizadas, durante la mayor parte del experimento la enzima se encuentra plegada incluso a altas temperaturas (12°, 25°, 30° y 37°C).

Después de obtener los valores del diámetro hidrodinámico, se calculó el valor del diámetro hidrodinámico teórico con el software de “Marlven Zetasizer Nano APS and UV versión 7.11”. Entonces, para una enzima con una masa molecular de 166.8 kDa que representa el valor del dímero de la CAT-2, se observó que tanto los valores teóricos como los experimentales coinciden; así que se puede inferir que el amortiguador de Tris-HCl favorece la formación del dímero en solución de la CAT-2.

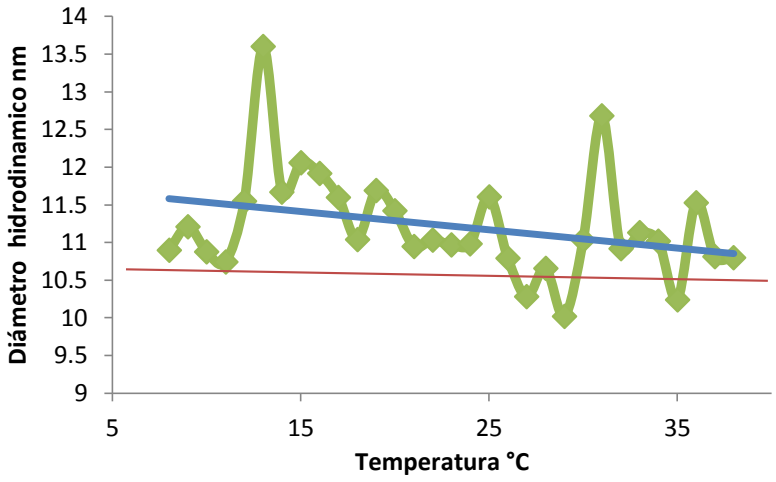


Figura 16. Efecto de la temperatura sobre el diámetro hidrodinámico de la CAT-2. La línea azul hace referencia a la tendencia del comportamiento del diámetro hidrodinámico de la CAT-2 en solución, la línea roja al tamaño del diámetro hidrodinámico teórico de la enzima..

Adicionalmente se realizaron tres experimentos para observar el comportamiento de la CAT-2 en solución en diferentes amortiguadores los cuales fueron:

- Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 (CAT-2 1 mg mL/ 6°C)
- Arginina 50 mM, pH 7.5 (CAT-2 1 mg mL/ 6°C)
- Fosfato dibásico de sodio/fosfato monobásico de potasio 50 mM, pH 6.2 (CAT-2 1 mg mL/ 6°C)

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 7. En la tabla se observa el promedio del radio hidrodinámico, la masa molecular experimental y la masa molecular teórica (calculada con el programa “Marlven Zetasizer Nano APS and UV versión 7.11”). El promedio de los datos experimentales se obtuvo después de realizar la medición por triplicado a 6° C para cada una de las tres condiciones. Estos resultados indican que en la muestra de CAT-2 se observan poblaciones diméricas de la enzima en solución. Lo anterior se dedujo después de calcular la masa molecular teórica a partir de la medición del radio hidrodinámico y comparándola con la masa molecular experimental que se había obtenido previamente por SDS-PAGE.

Tabla 7. Tabla comparativa de los radios hidrodinámicos de la CAT-2 en diferentes amortiguadores obtenidos con un equipo de DLS.

Condición	Promedio del Radio Hidrodinámico	Masa molecular teórica	Masa molecular
Tris -HCl 20 mM, pH 7.5	5.72 nm	177 1 kDa	166.8 kDa
Arginina 50 mM, pH 7.5	5.05 nm	148.8 kDa	166.8 kDa
Fosfato dibásico de sodio/fosfato monobásico de potasio 50 mM, pH 6.2	5.83 nm	177.9 kDa	166.8 kDa

Estos resultados también indican que el valor del radio hidrodinámico presenta pequeñas variaciones debido a las características de los diferentes amortiguadores en los que se encuentra la CAT-2 (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, Arginina 50 mM, pH 7.5 y fosfato dibásico de sodio/fosfato monobásico de potasio 50 mM, pH 6.2). Ya que como menciona Proteau *et al.,* (2010) el uso de aditivos puede influenciar en el comportamiento de la proteína en solución brindándole estabilidad. En sus trabajos, Proteau (2010) y Blobel (2011) nos sugieren el uso de aditivos y la concentración que se debe aplicar de cada uno de estos. Entre estos aditivos se menciona la L-arginina con una concentración entre 0.1-0.5 M. Considerando lo anterior, se decidió trabajar con el amortiguador de arginina 0.05 M, pH 7.5. Se observó que en este amortiguador el radio hidrodinámico de la enzima disminuye un poco, pero el valor del radio hidrodinámico se parece más al del dímero que al del monómero de la enzima.

También se debe resaltar que la enzima mantuvo un comportamiento monodisperso y homogéneo durante el análisis; esto se debe a que la CAT-2 se encuentra pura y sin otras proteínas asociadas a ella (Figura 17). De acuerdo a Ferré-D´Amaré (1994) las observaciones empíricas sugieren que las macromoléculas que presentan un comportamiento monodisperso en disolventes comunes pueden ser cristalizadas más fácilmente.

Los resultados de DLS para la CAT-2 sugieren que la enzima es estable en los tres amortiguadores utilizados y se puede sugerir que en los amortiguadores Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, fosfato dibásico de sodio/fosfato monobásico de potasio 50 mM, pH 6.2 y Arginina 50 mM, pH 7.5 la enzima se comporta como dímero, por lo cual sería ideal utilizarlos en las pruebas de cristalización.

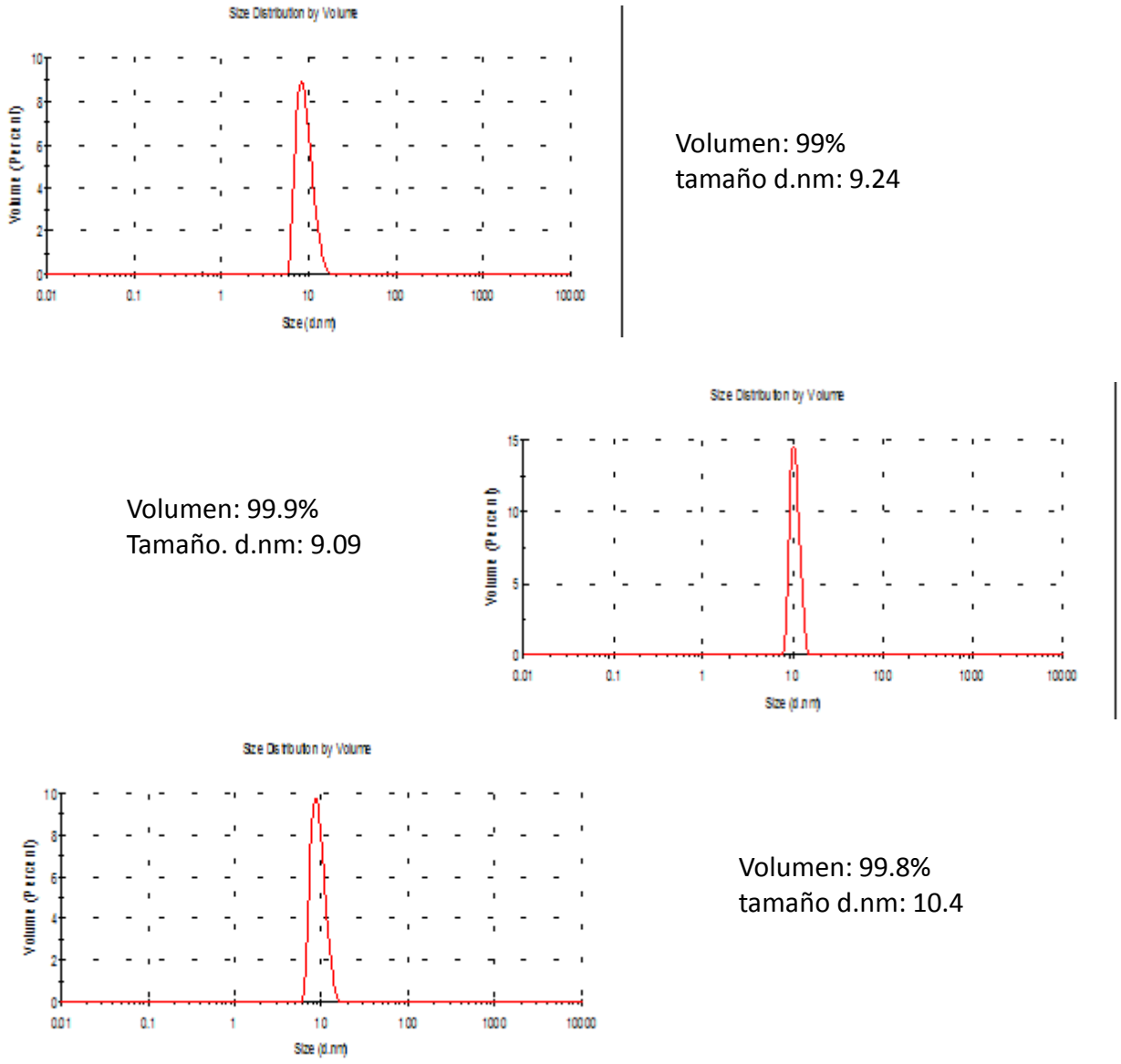


Figura 17. Graficas obtenidas del experimento de dispersión dinámica de luz. (A) Experimento con amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7.5. **(B)** Experimento con amortiguador de

Arginina 50 mM, pH 7.5. **(C)** Experimento con amortiguador de fosfato dibásico de sodio/fosfato monobásico de potasio 50mM, pH 6.2.

Cristalización de la CAT-2

Para las pruebas de cristalización se utilizó la enzima purificada por los métodos antes descritos y se emplearon los tres diferentes lotes de CAT-2 que se recibieron (Tabla 6).

Las primeras pruebas se establecieron utilizando el robot de cristalización "Mosquito LCP" con el método de gota colgante, la enzima que se utilizó fue la del lote A que estaba en amortiguador de Tris-HCl. En total se probaron 576 condiciones con los 11 kits de cristalización descritos en la metodología, todas las pruebas se incubaron a 18° C con una concentración de CAT-2 de 15 mg/mL.

Se obtuvieron los primeros cristales después de una semana en la gota E1 del kit "Crystal Screen Lite" (Figura 18A), estos cristales eran pequeños y de color café, lo que nos sugería que se trataba de cristales de la enzima. Cuatro meses después se encontraron dos cristales más, uno en la gota F2 del kit "Wizard 2" (Figura 18B) y otro en la gota D3 del kit "Crystal Screen Lite"(Figura 18C).

Seis meses después se encontraron seis cristales más, uno en la gota H6 del kit "Crystal Screen Cryo" (Figura 18D), uno más en la gota F1 del kit "Index 2" con un forma peculiar pero con el inconfundible color café de la enzima (Figura 18E), otro en la gota F6, tambien del kit "Index 2" (Figura 18F), al igual que en la gota A3 del kit "Crystal Screen Lite" se encontro un pequeño cristal color café (Figura 18G) y los dos ultimos cristales fueron encontados en las gotas F7 del kit "Index 2 (Figura 18H) y en la gota B2 del kit "Crystal Screen 1" (Figura 18I).

Una diferencia con los cristales que se obtubieron primero es que estos últimos eran mucho más grandes y la mayoría presentaban una forma semejante a navajas, además de su peculiar color café debido a la presencia del grupo hemo de la enzima.

En total se obtuvieron nueve condiciones de cristalización nuevas de la CAT-2 utilizando el amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 (Figura 18). Todos los cristales eran de color café.

En la tabla 8 se muestran las condiciones de cristalización encontradas para la CAT-2 durante este trabajo, así como los cristales que se difractaron y las soluciones crioprotectoras que se emplearon.

Tabla 8 Condiciones de cristalización encontradas para la CAT-2.

Gota	Condición de Cristalización	Kit	Amortiguador/ Concentración / Temperatura/ Método	Difracción/ Solución Crioprotectora
E1	Acetato de sodio 0.1 M, pH 4.6, cloruro de calcio 0.02 M y MPD 15%	"Crystal Screen Lite	Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 / 15 mg/mL / 18°C/ gota colgante	Sí/ Acetato de sodio 0.1 M, pH 4.6, cloruro de calcio 0.02 M y MPD 30%
F2	PEG 1,000 20%, amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 6.2 y cloruro de sodio 200 mM	"Wizard 2"	Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 / 15 mg/mL / 18°C/ gota colgante	Sí/ PEG 1,000 20%, PEG 400 30% amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 6.2 y cloruro de sodio 200 mM
D3	Hepes 100 mM, pH 7.5, PEG 400 40% y sulfato de amonio 1 M	"Crystal Screen Lite"	Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 /15 mg/mL /18°C/ gota Colgante	Sí/ Hepes 100 mM, pH 7.5, PEG 400 40%, glicerol 30% y sulfato de amonio 1 M
H6	Acetato de calcio 0.16 M, cacodilato de sodio 0.08 M, pH 6.5 y PEG 8,000 14.4 %	"Crystal Screen Cryo"	Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 / 15 mg/mL / 18°C/ gota Colgante	No
F1	Prolina 0.2 M, Hepes 0.1 M, pH 7.5 y PEG 3,350 10%	"Index 2"	Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 /15 mg/mL / 18°C/ gota colgante	Sí/ Prolina 0.2 M, Hepes 0.1 M, pH 7.5, PEG 400 40% y PEG 3,350 10%
F6	Sulfato de amonio 0.2 M, Bis-Tris 0.1 M, pH 5.5 y PEG 3,350 25%	"Index 2"	Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 /15 mg/mL / 18°C/ gota colgante	No
A3	Fosfato de amonio monobásico 0.2 M	"Crystal Screen Lite"	Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 /15 mg/mL / 18°C/ gota colgante	Sí/ Fosfato de amonio monobásico 0.2 M y glicerol 30%
A12	Cloruro de magnesio 20 mM, Hepes-Sodio 100 mM pH 7.5 e Isopropanol 30%	"Crystal Screen 1"	Arginina 50 mM, pH 7.5/15 mg/mL / 18°C/ gota sentada	Sí/ Cloruro de magnesio 20 mM, Hepes-Sodio 100 mM pH 7.5 e Isopropanol 65%

D10	PEG 8,000 10%, imidazol-HCl 100 mM, pH 8 y acetato de calcio 200 mM	“Wizard 1”	Fosfatos 50 mM, pH 7.5 15 mg/mL / 18°C/ gota sentada	No
B2	Cloruro de calcio dihidratado 0.2 M, Hepes-sodio 0.1 M pH 7.5 y PEG 400 28%	“Crystal Screen 1”	Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 / 15 mg/mL / 18°C/ gota colgante	Sí/ Cloruro de calcio 0.2 M dihidratado, Hepes-sodio 0.1 M pH 7.5 y PEG 400 40%
E4	Dioxano 35%	“Crystal Screen 2”	Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 /15 mg/mL / 18°C/ “Batch”	No
F7	Sulfato de Amonio 0.2 M, Bis-Tris 0.1 M, pH 6.5 y PEG 3,350 25%	“Index 2”	Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 /15 mg/mL / 18°C/ “Batch”	Sí/ Sulfato de Amonio 0.2 M, Bis-Tris 0.1 M, pH 6.5, PEG 400 20% y PEG 3,350 25%
A12	Cloruro de magnesio 20 mM, Hepes-Sodio 100 mM pH 7.5 e Isopropanol 30%	“Crystal Screen 1”	Arginina 50 mM, pH 7.5/15 mg/mL / 18°C/ gota sentada	No
D10	PEG 8,000 10%, imidazol-HCl 100 mM, pH 8 y acetato de calcio 200 mM	“Wizard 1”	Fosfatos 50 mM, pH 7.5 15 mg/mL / 18°C/ gota sentada	Sí/ PEG 8,000 10%, PEG 400 40% imidazol-HCl 100 mM, pH 8 y acetato de calcio 200 mM

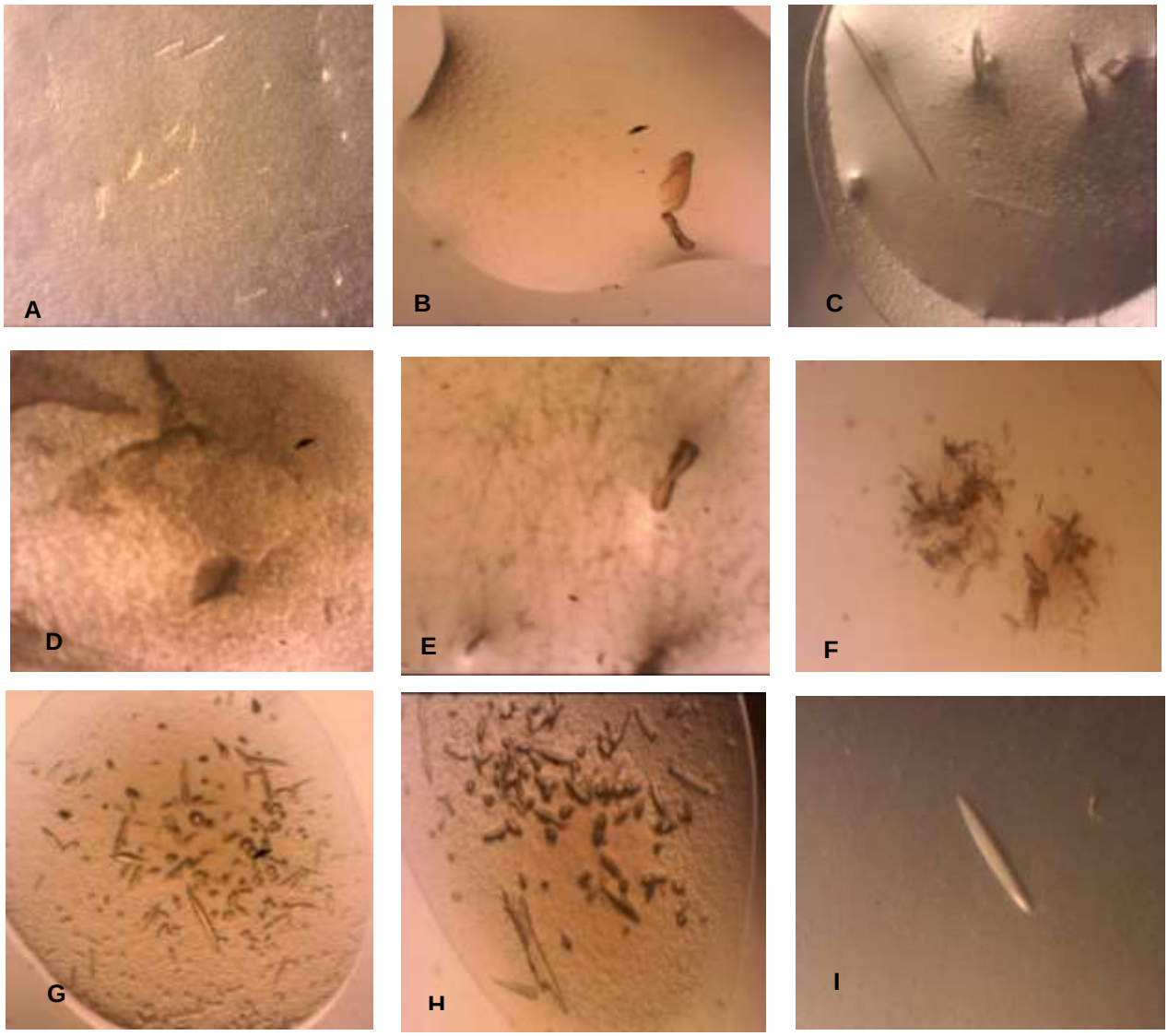


Figura 18. Cristales de la enzima CAT-2. (A) Cristales de la CAT-2 obtenidos en la condición E1 del kit "Crystal Screen Lite" en un amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7.5. (**B)** Cristales obtenidos en la condición F2 del kit "Wizard 2". **(C)** Cristales obtenidos en la gota D3 del kit "Crystal Screen Lite". **(D)** Cristales obtenidos en la gota H6 del kit "Crystal Screen Cryo". **(E)** Cristales obtenidos en la condición F1 del kit "Index 2". **(F)** Cristales de la CAT-2 obtenidos en la gota F6 del kit "Index 2". (**G)** Cristales de la CAT-2 obtenidos en las gotas A3 del kit "Crystal Screen Lite". **(H)** Cristales obtenidos en la gota D3 del kit "Crystal Screen Lite". **(I)** Cristales obtenidos en la gota B2 del kit "Crystal Screen 1".

Para las segundas pruebas de cristalización que se realizaron, se empleó el lote de enzima A y se utilizó el método de "batch" con los 11 kits de cristalización antes mencionados. Se pusieron en total 576 condiciones diferentes, la enzima

estaba a una concentración de 15 mg/mL y las placas fueron incubadas a 18° C. En estas pruebas se observaron precipitados en casi el 90% de las gotas, debido a la elevada concentración de CAT-2 dentro de la gota, pero después de ocho

meses se encontraron dos cristales de proteína del característico color café de la CAT-2, uno en la gota E4 del kit “Crystal Screen 2” y otro en la gota F7 del kit “Index 2” (Figura 19).

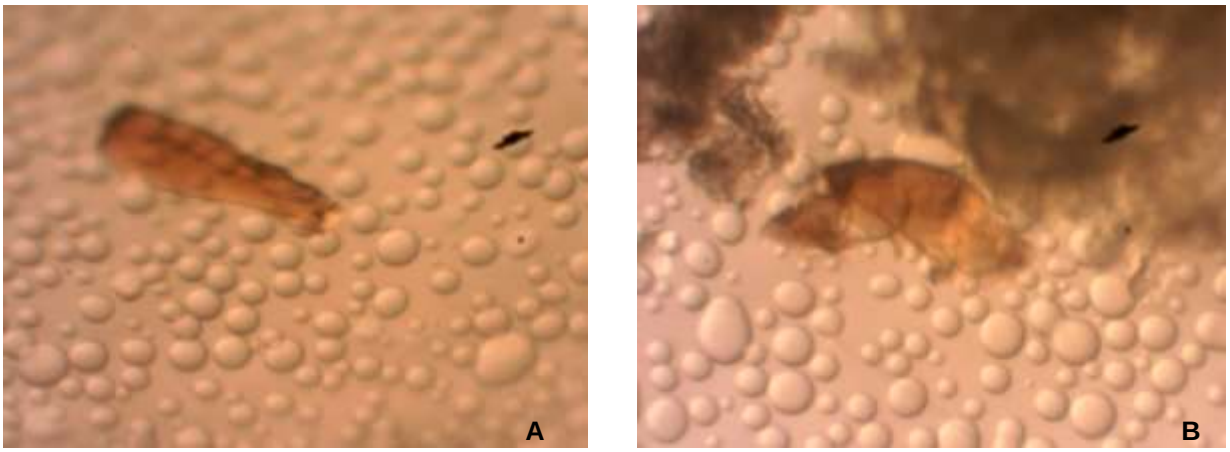


Figura 19. Cristales de enzima CAT-2 obtenidos con la técnica de “Batch”. (A) Cristales encontrados en la gota E4 del kit “Crystal Screen 2”. **(B)** Cristales encontrados en la gota F7 del kit “Index 2”

Con el fin de obtener un mayor número de cristales de CAT-2 a una parte del lote B de la enzima se cambió el amortiguador de Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 por amortiguador de arginina 50 mM, pH 7.5 y a otra parte por amortiguador de fosfatos (fosfato dibásico de sodio/fosfato monobásico de potasio) 50 mM, pH 6.2. Lo anterior, para favorecer la estabilidad de la enzima y conseguir cristales ordenados; ya que como muestra el programa XtalPred, la CAT-2 presenta cerca del 12% del total de sus residuos ubicados en forma desordenada lo cual dificulta la aparición de los núcleos cristalinos y predice que la CAT-2 es una enzima difícil de cristalizar (Figura 20).

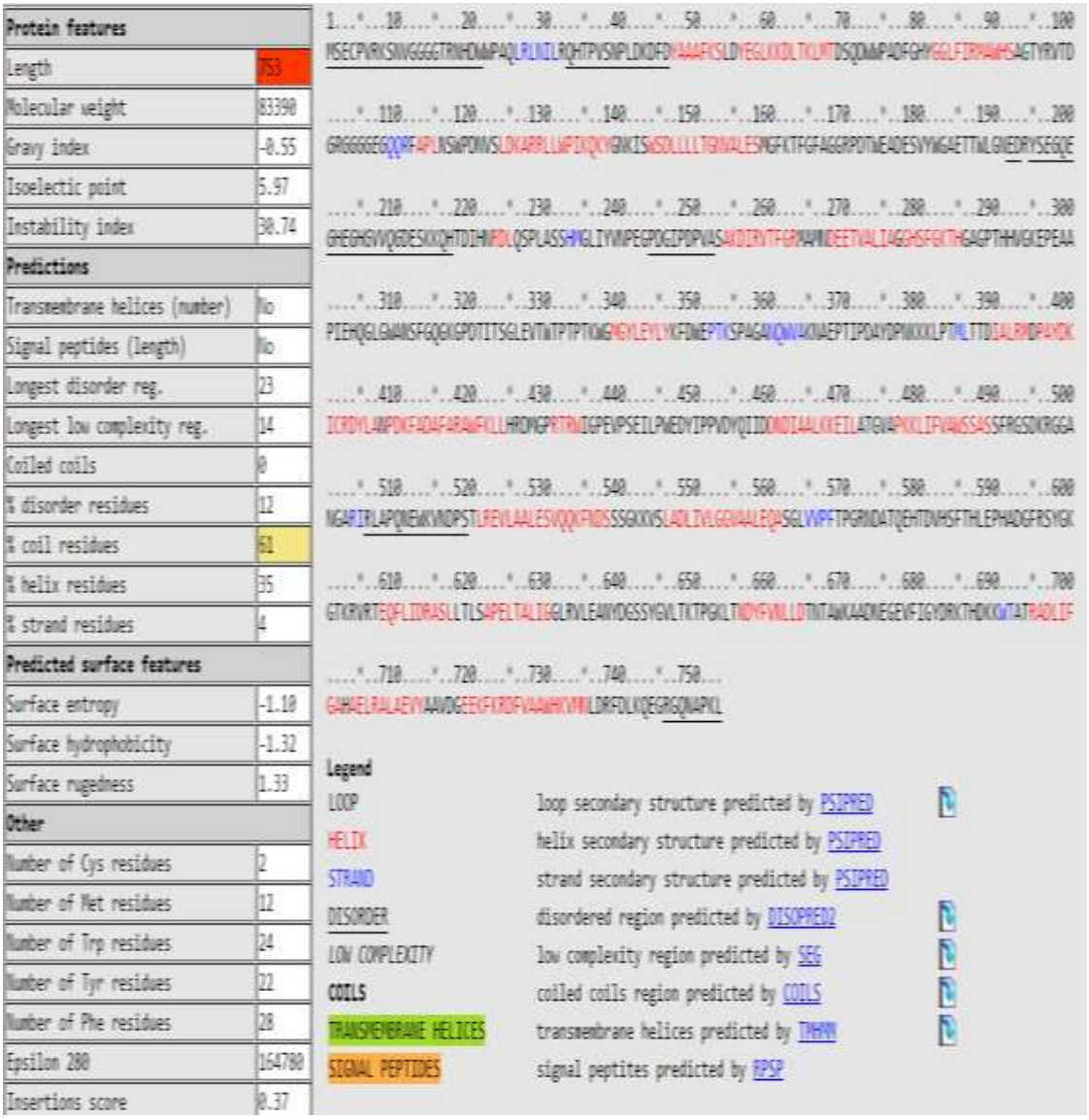


Figura 20. Resultados del programa XtalPred. La figura muestra las estadísticas y el orden de los aminoácidos ubicando los sitios desordenados de la enzima.

El amortiguador de arginina 50 mM, pH 7.5 se eligió considerando los resultados obtenidos por Blobel *et al., (*2011) donde se utiliza un amortiguador de arginina-glutamato (RE) a 50 mM, pH 6.5. En ese trabajo se reportó que este amortiguador puede reducir la agregación de las regiones desordenadas en las enzimas brindándoles estabilidad y minimizando el plegamiento desordenado de la misma. En aquél momento solo se utilizó el amortiguador de arginina, pero aun así

se encontró un cristal de CAT-2 en la gota A12 del kit “Crystal Screen 1 (Figura 21A).

La razón por la que se eligió utilizar también el amortiguador de fosfatos (fosfato dibásico de sodio/fosfato monobásico de potasio) 50 mM, pH 6.2 en los ensayos de cristalización fue que los cristales reportados anteriormente de las catalasas de *N. crassa* se obtuvieron en ese amortiguador (Díaz *et al*., 2004; Zarate-Romero *et al*., 2013), pero sobre todo porque la CP de *M. grisea* se obtuvo también en amortiguador de fosfatos (Zámocký *et al.,* 2012). Al igual que con el amortiguador de Arginina 50 mM, pH 7.5 con el amortiguador de fosfatos (fosfato dibásico de sodio/fosfato monobásico de potasio) 50 mM, pH 6.2 se obtuvo un cristal de la CAT-2 en la condición D10 del kit “Wizard 1” (Figura 21B).

A diferencia de los ocho cristales obtenidos con el amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, con el uso de los amortiguadores de arginina y fosfatos sólo se encontraron dos cristales más, pero se observó un incremento en el número de esferulitas y de agregados cristalinos en las pruebas, lo que nos indica una aproximación a la obtención de cristales.

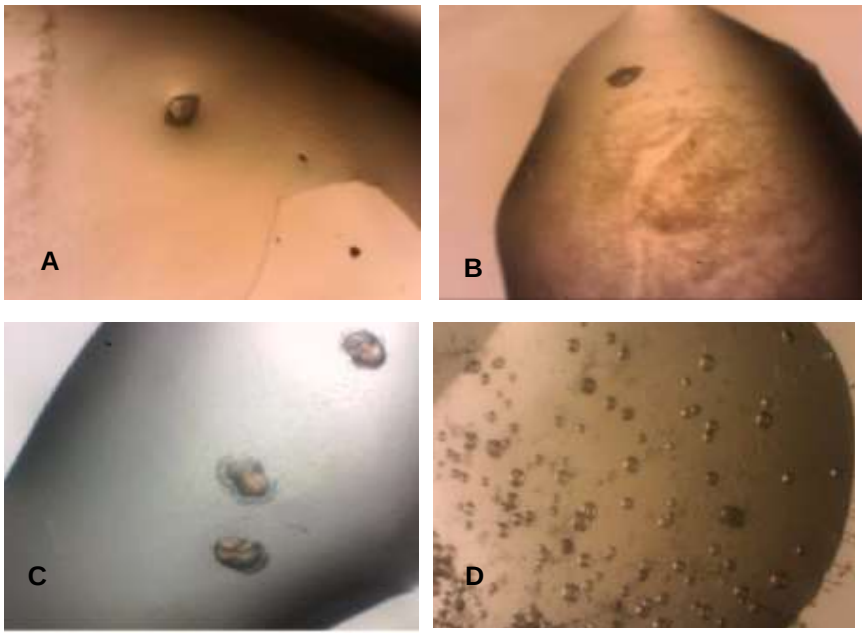


Figura 21. Cristales de la enzima CAT-2. (A) Cristales de la CAT-2 obtenidos en la condición A12 del kit “Crystal Screen 1” con un amortiguador de Arginina 50 mM, pH 7.5. **(B)** Cristales obtenidos

en la condición D10 del kit “Wizard 1” en un amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.5. **(C y D)** Esferulitas encontradas en las pruebas de cristalización.

Como se puede observar en la tabla 8 y las Figuras 17 a 20 todas las condiciones de cristalización donde se obtuvieron cristales de la CAT-2 son diferentes, ya que si las comparamos entre ellas la única característica que se encuentra en más de una de las gotas es la presencia del PEG como agente precipitante, aunque con diferentes masas moleculares que van desde 400 a 8,000. Otra característica que podemos destacar es la combinación de la gota F2, donde el amortiguador es de fosfatos (fosfato dibásico de sodio/fosfato monobásico de potasio) 50 mM, pH 6.2 muy similar al que se empleó para las pruebas de cristalización del lote C de la enzima. Con lo anterior podemos sugerir que este amortiguador le da características apropiadas a la CAT-2 para cristalizar, lo que concuerda con los datos registrados de las condiciones de cristalización de las otras CATS de *N. crassa* y la CP de *M. grisea.*

Con el amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 se obtuvieron un mayor número de cristales que crecieron en un tiempo prolongado, lo que podría indicar un arreglo más ordenado de la enzima en del cristal.

También se sugiere que el amortiguador donde se encuentra una proteína para cristalizar tenga una concentración de 10 mM para evitar la competencia con el amortiguador del agente precipitante, que se encuentra a 100 mM (Rojas, 2015. Resultados sin publicar). Aunque para las pruebas de cristalización de la CAT-2 los amortiguadores en los que se encuentra la enzima están más concentrados. El objetivo de utilizarlos a 50 mM era obtener una enzima estable que cristalizara. Además de que, como lo muestran los resultados se obtuvieron muchos cristales de la CAT-2 en las pruebas de cristalización realizadas. También es importante mencionar que aunque en las soluciones precipitantes se encuentran altas cantidades de sales o incluso la presencia de sulfato de amonio descartamos la posibilidad de que los cristales encontrados sean de sal, debido al inconfundible color café de la CAT-2. Estos resultados también se pueden relacionar con los obtenidos en los análisis de DLS, donde la enzima se muestra pura con un

comportamiento monodisperso y homogéneo, lo cual eleva las probabilidades de que la CAT-2 cristalice como lo reporta Ferré-D'Amaré *et al*., (1994) y Proteau *et al.,* (2010).

Optimización de la cristalización de la CAT-2

Una vez obtenidos los cristales de CAT-2 se procedió a optimizar algunas de las condiciones, con el fin de obtener más cristales y de mayor tamaño.

La primer gota en ser optimizada fue la E1 del kit “Crystal Screen Lite” (acetato de sodio 0.1 M, pH 4.6, cloruro de calcio 0.02 M y MPD 15%). Aquí la enzima se encontraba en el amortiguador Tris HCl 20 mM, pH 7.5, a 15 mg/mL y la placa se incubó a 18° C. La matriz que se diseñó contenía en total 36 condiciones cercanas a la inicial. El amortiguador de la solución madre (acetato de sodio 0.1 M, pH 4.6) se mantuvo constante para todas las condiciones y entonces sólo se variaron las concentraciones de sal (cloruro de calcio 0.02 M) y el agente precipitante (MPD) (Tabla 1). Desafortunadamente en esta matriz no hubo la aparición de cristales.

Posteriormente se optimizaron cuatro condiciones más. Para este paso se utilizó el lote C de la CAT-2. Como se puede observar en las tablas 1 a 5 los amortiguadores de las condiciones de cristalización se mantuvieron constantes.

Para la gota D10 del kit “Wizard 1” se utilizó una matriz donde se varió el agente precipitante (PEG 8,000) y la sal (acetato de calcio 0.2 M) sin embargo, en ninguna de las nuevas gotas se observó la aparición de cristales. En la condición A12 del kit “Crystal Screen 1” se varió la cantidad del isopropanol que servía como agente precipitante y el cloruro de magnesio como la sal, pero no se presentaron resultados positivos, lo mismo que en las optimizaciones anteriores.

La siguiente optimización fue para la gota D3 del kit “Crystal Screen Lite”, donde se utilizó sulfato de amonio como sal y como agente precipitante PEG 400 2%, pero tampoco se obtuvieron cristales. Y para finalizar la gota F2 del kit “Wizard 2” se optimizó al modificar el agente precipitante PEG 1,000 y la sal que

era cloruro de sodio, pero no aparecieron cristales. Para todas las condiciones se mantuvo constante la concentración de proteína a 15 mg/mL y las placas de cristalización se incubaron a una temperatura de 18°C.

La cristalización es un cuello de botella en la determinación de estructuras cristalográficas, ya que es el paso menos controlado del proceso, debido a que intervienen propiedades físicas y químicas que afectan la solubilidad de la macromolécula (Giege, 1992; Rojas, 2015 resultados sin publicar; D´Ámare y Burley 1994; Proteau *et al.,* 2010). En muchas ocasiones como en los pasos de optimización descritos en este trabajo es posible que aunque se conozcan las condiciones de cristalización y ya se hayan encontrado cristales, estos no vuelvan a aparecer en las matrices de optimización. Entre los factores que pueden llegar a afectar se encuentran: la estabilidad de la proteína a cristalizar y el almacenamiento de la muestra, la manipulación, y los factores fisicoquímicos.

Aunque en estos casos particulares el cambio de preparar las placas con un robot de cristalización y después realizar las matrices de optimización manualmente, se sabe que puede ser tan crítico que resulta imposible volver a obtener los cristales.

Difracción de rayos X de los cristales de CAT-2

Los primeros datos de difracción se obtuvieron en septiembre de 2014 en la línea X6A del National Synchrotron Light Source, NSLS (New York). La solución crioprotectora del cristal contenía acetato de sodio 100 mM, MPD 65% y cloruro de calcio 1 M (gota E1 del kit “Crystal Screen Lite”). No se colectaron datos de difracción de rayos X porque la resolución fue de 7 Å, pero se confirmó que el cristal era de la enzima.

Posteriormente en mayo de 2015 se congelaron y probaron ocho cristales más (cristales de las gotas B2, F7, A3, F6, F1, H6, D3, F2, véase en la tabla 8) en la línea 11-1 del sincrotrón de Stanford, SSRL (Stanford Synchrotron Radiation Lightsource, por sus siglas en inglés). En esta ocasión, tampoco se colectaron datos de difracción de rayos X ya que las imágenes que se colectaron mostraban

que los cristales en efecto eran de proteína pero también que eran policristales, esto quiere decir que el agregado de átomos que está dentro del cristal no está estructurado dentro de una red periódica tridimensional si no que se encuentra dentro de varias, por lo tanto no se pudo definir la celda unitaria, el grupo espacial ni la resolución del contenido del cristal (Figura 22).

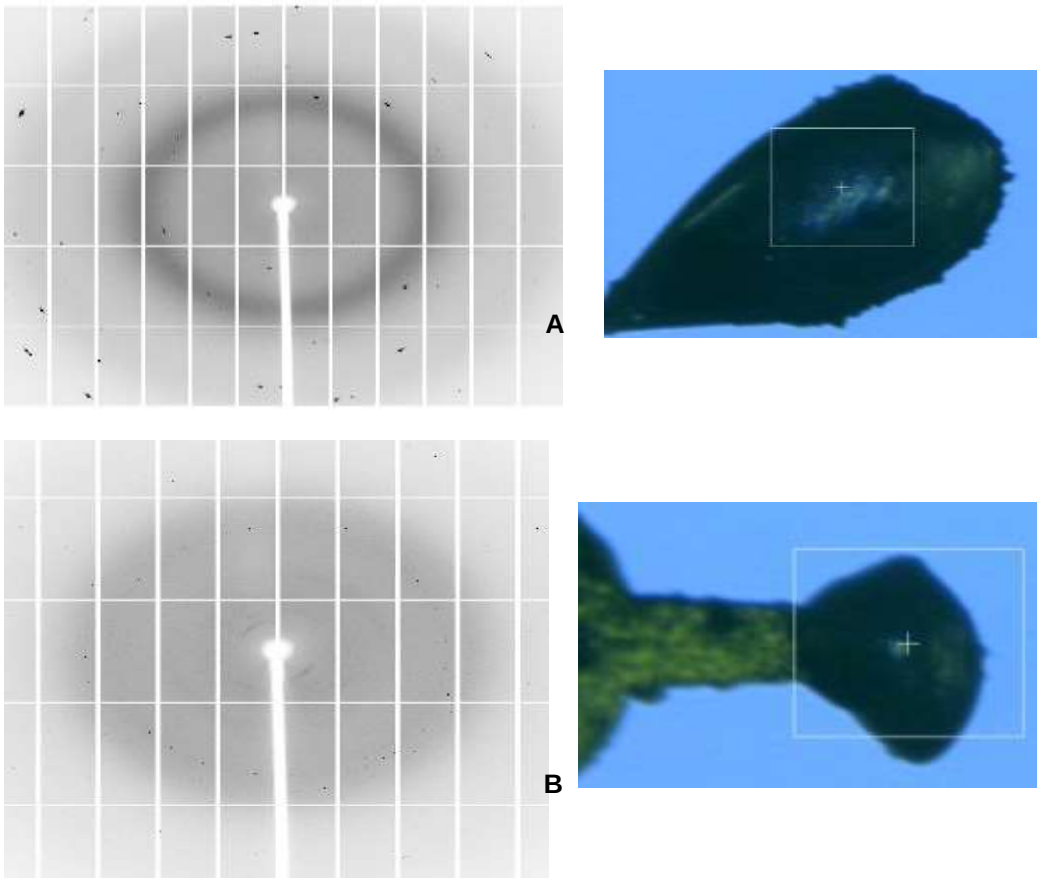
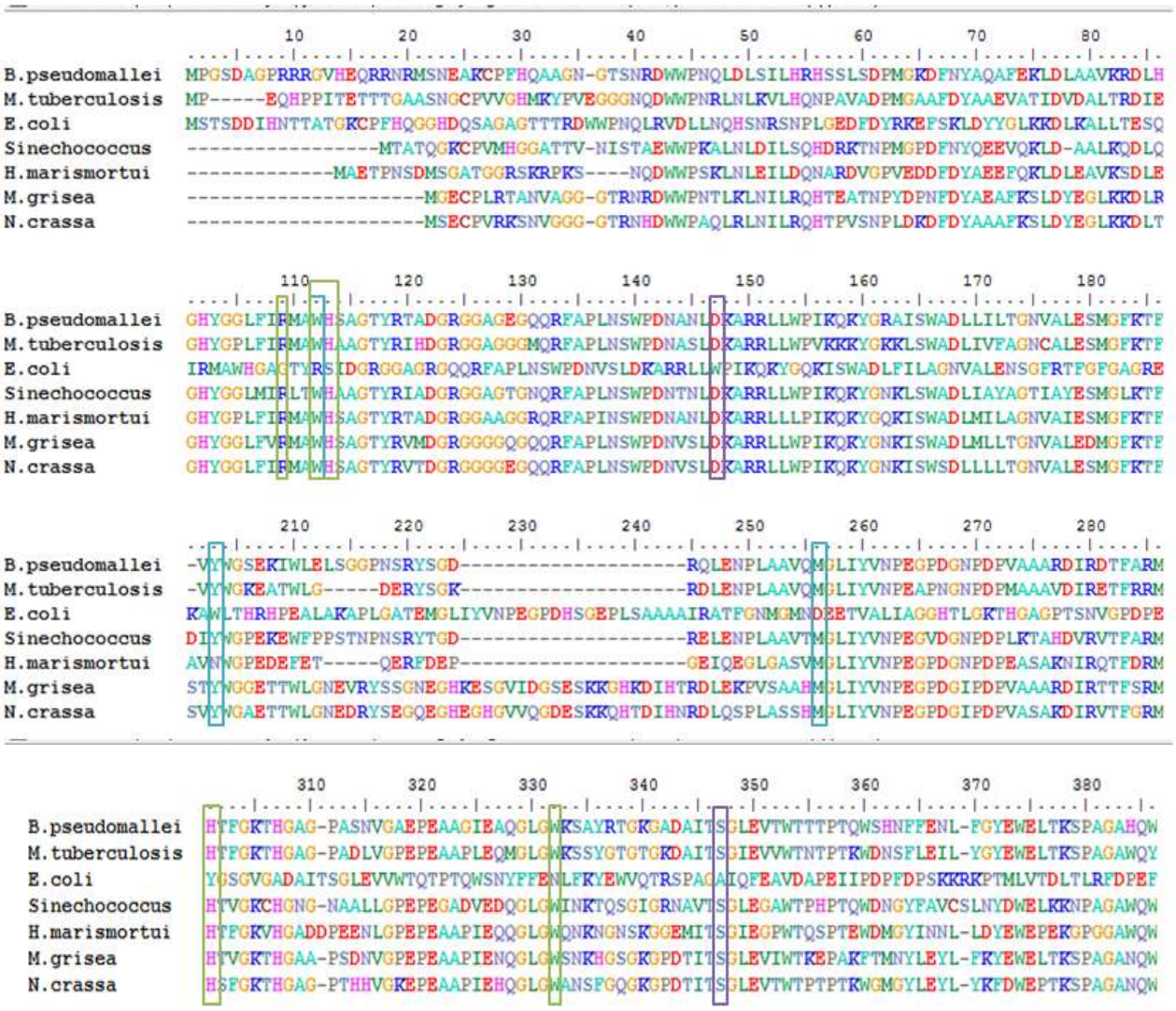


Figura 22. Patrones de difracción de la CAT-2. (A) Patrón de difracción del cristal encontrado en la gota A12 del kit “Crystal Screen 1” a un costado la imagen del cristal antes de ser difractado **(B)** Patrón de difracción del cristal encontrado en la gota F1 del kit “Index 2” a un costado la imagen del cristal antes de ser difractado.

En este caso se debe de trabajar con las condiciones de cristalización para mejorarlas y así obtener cristales mucho más ordenados con el fin obtener mejores patrones de difracción que permitan determinar la estructura tridimensional de la enzima.

Análisis de secuencia y generación de un modelo de la CAT-2

Se realizó un alineamiento con la secuencia de residuos de aminoácidos de la CAT-2, el cual indica que su secuencia es similar a la de las otras CP's de las cuales ya se conoce su estructura cristalográfica y están depositadas en el PDB. En el alineamiento se observa que los residuos del sitio catalítico (Arg/Trp/His) del lado proximal se encuentran conservados, al igual que la otra triada (His/Trp/Asp) en el lado distal (Figura 23).



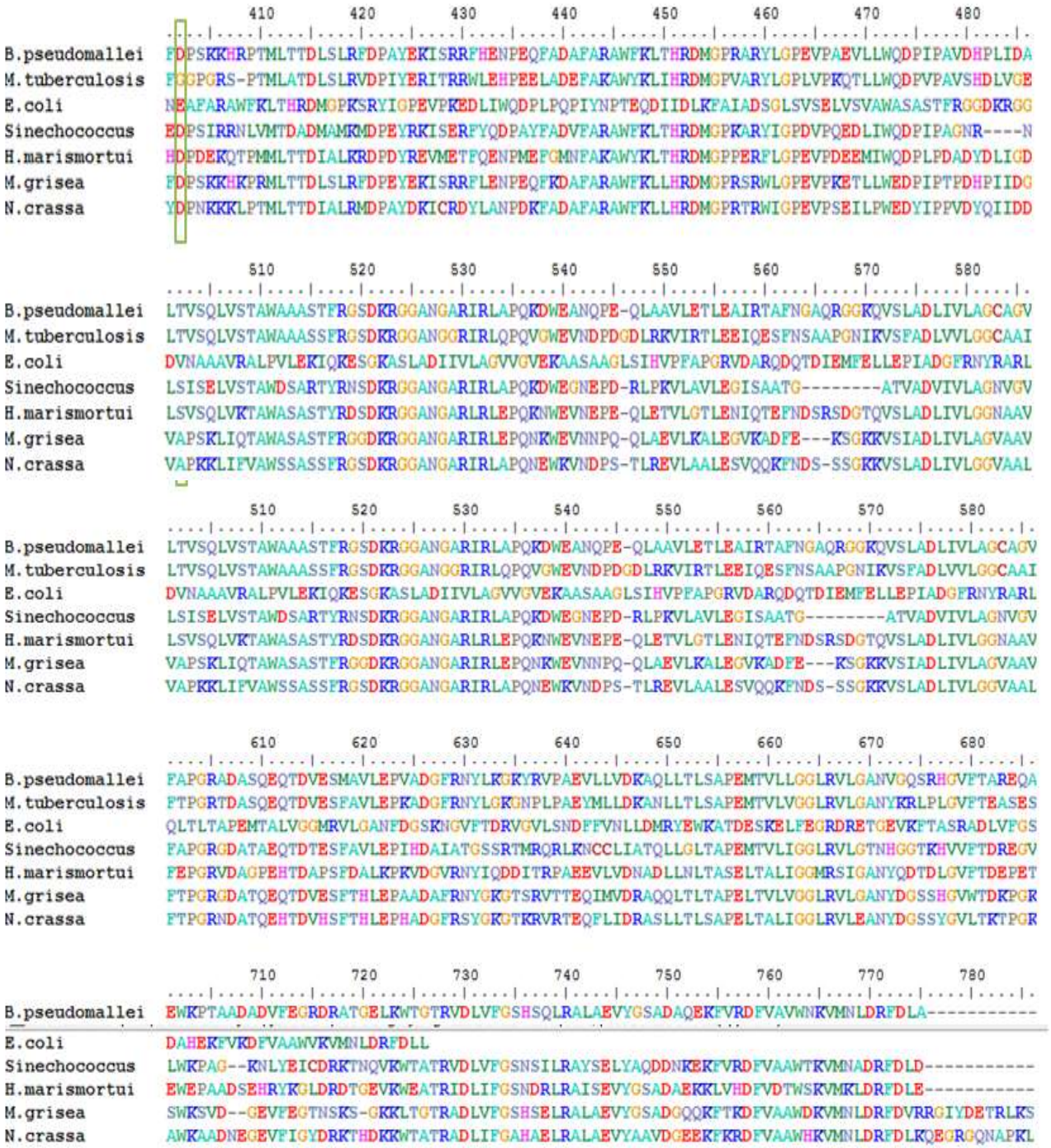


Figura 23. Alineamiento de las secuencias de las CP´s que cuentan con estructura cristalográfica junto con la CAT-2. El alineamiento se realizó con las secuencias de *B. pseudomallei, M. tuberculosis, E. coli, S. elongatus, H. marismortui y M. grisea.* Al final del alineamiento se incluyó la secuencia de la CAT-2 de *N. crassa*. Se indican algunos de los residuos importantes para la catálisis de las CP´s en recuadros color verde, los residuos del aducto

covalente en recuadros color azul y los residuos encargados de controlar el acceso al lado distal del hemo en morado (Alineamiento realizado con el programa BioEdit).

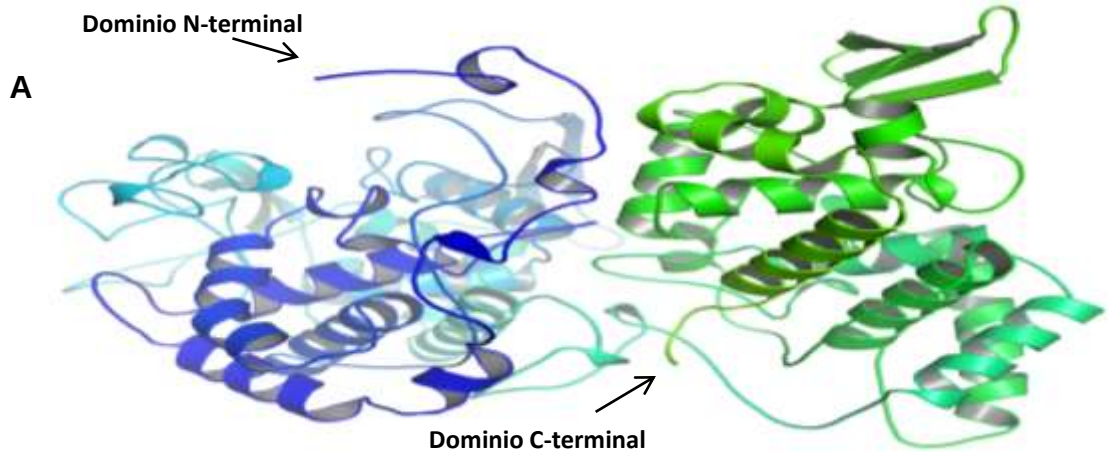
Además del alineamiento de secuencias se realizó un análisis de BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) con el fin de conocer la identidad que tiene la CAT-2 con las secuencias de las CP´s previamente alineadas. Las identidades de secuencia se muestran en la tabla 10.

Tabla 9. Identidad de secuencia de la CAT-2 con otras CP´s.

BLAST	
Organismo	**Identidad**
Burkolderia *pseudomallei*	**63%**
Sinechococcus elongatus	**53%**
Mycobacterium tuberculosis	**57%**
Escherichia coli C-Ter	**54%**
Haloarcula marismortui	**55%**
Magnaporthe grisea	**62%**

También se generó un modelo tridimensional con la secuencia de la CAT-2, con el fin de mostrar las características estructurales que la hacen diferente a las otras CP´s. El modelo se construyó con base a la identidad de la CAT-2 y las otras CP's cuya estructura se conoce, especialmente con la CP de *M. grisea* utilizando el programa SWISS MODEL de ExPASy. El programa generó tres modelos, pero se eligió el que tomaba como referencia principal la secuencia de la CP de *M. grisea*. Lo anterior se decidió después de analizar todos los modelos, donde se observó que de los tres, este era el que presentaba una cadena principal mucho más completa comparada con los otros dos modelos, así como el presentar un 62% de identidad de secuencia con la CAT-2 y sin olvidar que ambas CP´s son de hongos, por lo cual presentan una semejanza estructural mayor.

En el modelo se pueden observar las interacciones importantes para la formación del dímero, como el entrecruzamiento del dominio más grande, N-terminal de uno de los monómeros con el dominio más pequeño, C-terminal de la otra subunidad. También se observa como las dos subunidades del dímero presentan una extensa superficie de contacto, pero esta no representa una interdigitación significativa (Carpena *et al*., 2003). Además se pueden ubicar a los residuos de aminoácidos catalíticos del sitio activo y los que coordinan al grupo hemo, la extensión de los 26 residuos de las hélices E y D pertenecientes al asa LL1 y la arquitectura de los dominios N-terminal donde se localiza el hemo y la del C-terminal donde no se une el hemo pero que mantiene la estructura para que este se una.



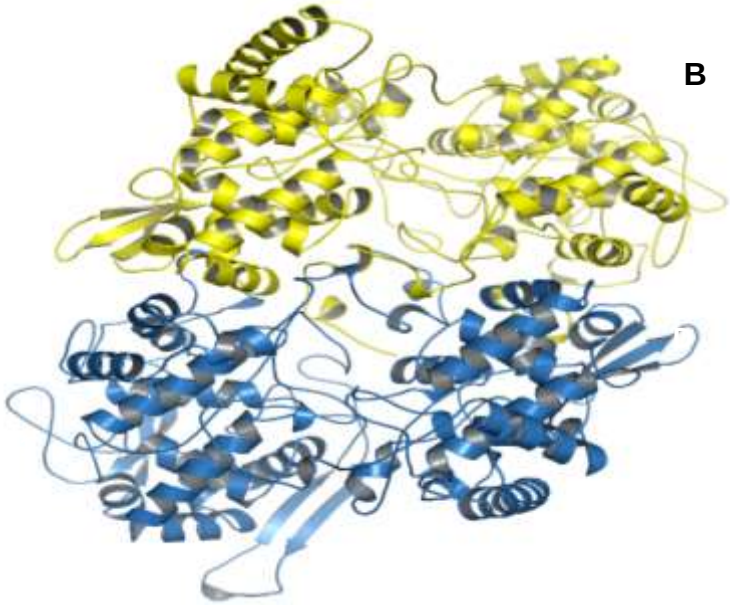


Figura 23. Modelo de la CAT-2. (A) Vista del monómero de la enzima donde se muestran los dominios N-terminal y C-terminal. **(B)** Vista del dímero de la CAT-2. En la imagen se observan las asas LL1 y LL2 encargadas de conducir el H_2O_2 al grupo hemo, así como la vista de algunas interacciones intramonoméricas importantes para la formación del dímero de la CAT-2. (Las Imágenes se generaron con las coordenadas de SWISS MODEL en el programa PyMOL).

Conclusiones

- Se comprobó que la CAT-2 se encontraba pura, lo anterior se demostró por cromatografía de exclusión molecular, determinación del pI y los análisis de DLS.
- Los análisis de DLS demostraron que la CAT-2 mantiene un comportamiento homogéneo y monodisperso en solución, además de mostrarse como una enzima estable, incluso a altas temperaturas.
- Los amortiguadores más adecuados para la cristalización de la CAT-2 son el amortiguador de Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 y el amortiguador de fosfatos (fosfato dibásico de sodio/fosfato monobásico de potasio) 50mM, pH 6.2 ya que además de brindarle una gran estabilidad a la enzima favorecen la formación del dímero en solución.
- Se logró cristalizar la catalasa-peroxidasa de *Neurospora crassa,* obteniendo en total 12 nuevas condiciones de cristalización para la enzima.
- Se difractaron 9 de los 12 cristales obtenidos, comprobándose que todos eran de proteína, pero estos no fueron adecuados para la colecta de datos.

Perspectivas

- Establecer pruebas de cristalización utilizando el amortiguador arginina-glutamato.
- Repetir y optimizar las condiciones de cristalización.
- Realizar pruebas de cristalización a 4 y 12°C variando también la concentración de la enzima.
- Generar nuevas construcciones de la CAT-2.
- Obtener la estructura cristalográfica de la CAT-2.

Bibliografía citada

Baker, R. D., Cook, C. O., Goodwin, D. C. (2004). Properties of catalase–peroxidase lacking its C-terminal domain. Biochemical and biophysical research communications, *320*(3), 833-839.

Bertrand, T., Eady, N. A., Jones, J. N., Nagy, J. M., Jamart-Grégoire, B., Raven, E. L. Brown, K. A. (2004). Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase. Journal of Biological Chemistry, 279(37), 38991-38999.

Blobel, J., Brath, U., Bernadó, P., Diehl, C., Ballester, L., Sornosa, A., Pons, M. (2011). Protein loop compaction and the origin of the effect of arginine and glutamic acid mixtures on solubility, stability and transient oligomerization of proteins. European Biophysics Journal, *40*(12), 1327-1338.

Campos, A. (2010) *Refinamiento de estructuras cristalográficas de lacasas* depositadas en el Protein Data Bank. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos. pp 4-10

Carpena, X., Loprasert, S., Mongkolsuk, S., Switala, J., Loewen, P. C. Fita, I. (2003). Catalase-peroxidase KatG of *Burkholderia pseudomallei* at 1.7 Å resolution. Journal of Molecular Biology, 327(2), 475-489.

Cuadros-Moreno, A., Pimentel, R. C. San Martín-Martínez, E. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Lat. Am. J. Phys. Educ. Vol*, *8*(4), 4314-1.

De los Ríos, J. A., Sahuquillo, J., Merino, M. A., Poca, M. A. Expósito, L. (2009). Microdiálisis de alta resolución: Aspectos metodológicos y aplicación al estudio de la respuesta inflamatoria cerebral. *Neurocirugía*, *20*(5): 433-448.

Díaz, A. (2004). *Análisis estructural y cinético de la catalasa-1 de Neurospora crassa*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF. pp 72.

Díaz, A., Horjales, E., Rudiño-Piñera, E., Arreola, R. Hansberg, W. (2004). Unusual Cys-Tyr covalent bond in a large catalase. Journal of Molecular Biology, 342(3), 971-985.

Díaz, A., Loewen, P. C., Fita, I. Carpena, X. (2012). Thirty years of heme catalases structural biology. Archives of Biochemistry and Biophysics 525(2): 102-110.

Díaz, A., Muñoz-Clares, R. A., Rangel, P., Valdés, V. J. Hansberg, W. (2005). Functional and structural analysis of catalase oxidized by singlet oxygen. Biochimie *87*(2): 205-214.

Domínguez, L., Sosa-Peinado, A. Hansberg, W. (2010). Catalase evolved to concentrate H_2O_2 at its active site. Archives of Biochemistry and Biophysics 500(1): 82-91.

Ducuix, A. Giegé, R. (1992) Crystallization of Nucleic Acid and Proteins. Oxford University Press. U.K., pp 8-10.

Ferré-D'Amaré, A. R. Burley, S. K. (1994). Use of dynamic light scattering to assess crystallizability of macromolecules and macromolecular assemblies. Structure *2*(5):357-359.

Hansberg, W. Aguirre, J. (1990). Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. Journal of Theoretical Biology,142 (2): 201-221.

Hansberg, W., De Groot, H. Sies, H. (1993). Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. Free Radical Biology and Medicine 14(3): 287-293.

Hansberg, W., Salas-Lizana, R. Domínguez, L. (2012). Fungal catalases: function, phylogenetic origin and structure. Archives of Biochemistry and Biophysics 525(2): 170-180.

Hochman, A. Goldberg, I. (1991). Purification and characterization of a catalase-peroxidase and a typical catalase from the bacterium *Klebsiella pneumoniae*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology 1077(3): 299-307.

Jakopitsch, C., Auer, M., Ivancich, A., Rüker, F., Furtmüller, P. G. Obinger, C. (2003). Total conversion of bifunctional catalase-peroxidase (KatG) to monofunctional peroxidase by exchange of a conserved distal side tyrosine. Journal of Biological Chemistry 278(22): 20185-20191.

Jakopitsch, C., Droghetti, E., Schmuckenschlager, F., Furtmüller, P. G., Smulevich, G. Obinger, C. (2005). Role of the main access channel of catalase-peroxidase in catalysis. Journal of Biological Chemistry *280*(51): 42411-42422.

Jakopitsch, C., Kolarich, D., Petutschnig, G., Furtmüller, P. G. Obinger, C. (2003). Distal side tryptophan, tyrosine and methionine in catalase–peroxidases are covalently linked in solution. FEBS letters 552(2): 135-140.

Lorber, B., Fischer, F., Bailly, M., Roy, H. Kern, D. (2012). Protein analysis by dynamic light scattering: methods and techniques for students. Biochemistry and Molecular Biology Education, *40*(6): 372-382.

McPherson, A. (2004). Introduction to protein crystallization. Methods, 34(3), 254-265 pp.

McPherson, A. Cudney, B. (2014). Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules. *Structural Biology and* Crystallization Communications 70(11): 1445-1467.

McPherson, A. Gavira, J. A. (2014). Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F:* Structural Biology Communications *70*(1): 2-20.

Moore, R. L., Powell, L. J. Goodwin, D. C. (2008). The kinetic properties producing the perfunctory pH profiles of catalase-peroxidases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 1784(6): 900-907.

Njuma, O. J., Ndontsa, E. N. Goodwin, D. C. (2014). Catalase in peroxidase clothing: interdependent cooperation of two cofactors in the catalytic versatility of KatG. Archives of Biochemistry and Biophysics, 544, 27-39.

Peraza, L. (2005). *Caracterización genética y enzimática de una catalasa-peroxidasa de Neurospora crassa.* Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF. pp 115

Perutz, M. F., Rossmann, M. G., Cullis, A. F., Muirhead, H. Will, G. (1960). Structure of hemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å. resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*, *185*, 416-422

Proteau, A. Shi, R. Cygler, M. (2010) Application of dynamic light scattering in protein crystallization, Curr. Protc Protein Scl 61.17.10.1-17.10.9

Rojas, S. (2015). Cristalización. (Resultados sin publicar). Cuernavaca Morelos.

Rudiño-Piñera, E. (2010). Cristalografía. 1° ed. [ebook] Cuernavaca, Morelos, 1-2 pp. Visto en http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Cristalografia.pdf (Acceso el 10 de Abril. 2015)

Singh, R., Wiseman, B., Deemagarn, T., Donald, L. J., Duckworth, H. W., Carpena, X. Loewen, P. C. (2004). Catalase-peroxidases (KatG) exhibit NADH oxidase activity. Journal of Biological Chemistry *279*(41): 43098-43106.

Singh, R., Wiseman, B., Deemagarn, T., Jha, V., Switala, J. Loewen, P. C. (2008). Comparative study of catalase-peroxidases (KatGs). Archives of Biochemistry and Biophysics, 471(2), 207-214.

Smulevich, G., Jakopitsch, C., Droghetti, E. Obinger, C. (2006). Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG). Journal of Inorganic Biochemistry 100(4): 568-585.

Takemoto, D., Tanaka, A. Scott, B. (2007). NADPH oxidases in fungi: diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation. Fungal Genetics and Biology 44(11): 1065-1076.

Vega, V. (2007). *Sobre-expresión de la Catalasa-peroxidasa de Neurospora crassa.* Tesis de licenciatura*.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF. pp 53.

Vega, V. (2011). *En busca de la función de la catalasa-peroxidasa de Neurospora crassa.* Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF. pp 55.

Velasquez, G. (2009). Análisis y afinamiento de estructuras proteicas con cobre depositadas en el Protein Data Bank. Tesina. Universidad Politécnica del Estado de Morelos. Jiutepec, Morelos. pp 1-2.

Vidossich, P., Alfonso-Prieto, M. Rovira, C. (2012). Catalases versus peroxidases: DFT investigation of H_2O_2 oxidation in models systems and implications for heme protein engineering. Journal of Inorganic Biochemistry,117, 292-297.

Vlasits, J., Jakopitsch, C., Schwanninger, M., Holubar, P. Obinger, C. (2007). Hydrogen peroxide oxidation by catalase-peroxidase follows a non-scrambling mechanism. FEBS letters, 581(2): 320-324.

Wada, K., Tada, T., Nakamura, Y., Kinoshita, T., Tamoi, M., Shigeoka, S. Nishimura, K. (2002). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of catalase–peroxidase from *Synechococcus* PCC 7942. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 58(1): 157-159.

Watson, J. D. Crick, F. H. (1993). Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *JAMA*, *269*(15), 1967-1969.

Wilson, W. W. (2003). Light scattering as a diagnostic for protein crystal growth—A practical approach. *Journal of Structural Biology 142*(1): 56-65.

Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z. Jaskolski, M. (2008). Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. Febs Journal 275(1): 1-21.

Yamada, Y., Fujiwara, T., Sato, T., Igarashi, N. Tanaka, N. (2002). The 2.0 Å crystal structure of catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. Nature Structural and Molecular Biology, 9(9), 691-695.

Zámocký, M. Koller, F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and *in vitro* mutagenesis. Progress in biophysics and molecular biology, 72(1), 19-66.

Zámocký, M., Furtmüller, P. G. Obinger, C. (2008). Evolution of catalases from bacteria to humans. Antioxidants and Redox Signaling, 10(9), 1527-1548.

Zámocký, M., Furtmüller, P. G. Obinger, C. (2009). Two distinct groups of fungal catalase/peroxidases. Biochemical Society Transactions, 37(4), 772.

Zámocký, M., García-Fernández, Q., Gasselhuber, B., Jakopitsch, C., Furtmüller, P. G., Loewen, P. C. Carpena, X. (2012). High Conformational Stability of Secreted Eukaryotic Catalase-peroxidases Answers from first crystal structure and unfolding studies. Journal of Biological Chemistry, 287(38): 32254-32262.

Zámocký, M., Janeček., Š. Koller, F. (2000). Common phylogeny of catalase-peroxidases and ascorbate peroxidases. Gene 256(1): 169-182.

Zámocký, M., Regelsberger, G., Jakopitsch, C. Obinger, C. (2001). The molecular peculiarities of catalase-peroxidases. Febs Letters 492(3): 177-182.

Zárate-Romero, A., Stojanoff, V., Rojas-Trejo, S. P., Hansberg, W. Rudiño-Piñera, E. (2013). Conformational stability and crystal packing: polymorphism in

Neurospora crassa CAT-3. Acta Crystallographica *Section F:* Structural Biology and Crystallization Communications 69(7): 753-758.