



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

DETECCION INTRACELULAR DE CATALASAS DURANTE EL
CICLO DE CRECIMIENTO Y CONIDIACION DE
Neurospora crassa.

TESIS

Para obtener el Titulo de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presentada por
YESIKA MONTES DE OCA SILVA

Asesores

Dr. En C. Wilhelm Hansberg Torres
M.V.Z. Nuria de Buen de Argüero

México D.F. Octubre, 1999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

275345



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**DETECCION INTRACELULAR DE CATALASAS DURANTE EL
CICLO DE CRECIMIENTO Y CONIDIACION DE *Neurospora crassa*.**

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

de la

Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista

por

Yésika Montes de Oca Silva

Asesores:

Dr. en C. Wilhelm Hansberg Torres
MVZ. Nuria de Buen de Argüero

México, D.F.

Octubre, 1999.

Agradecimientos

Agradezco muy especialmente al Dr. Wilhelm Hansberg Torres por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación y por el tiempo dedicado a mi desarrollo y superación.

A Pablo Rangel Silva por todos los conocimientos que me ha transmitido y ser un gran guía de mi trabajo, por ser de las personas que considero un amigo.

A Fernando Liedías Martínez por la paciencia y el tiempo dedicado a mi educación en el laboratorio.

A Jorge Sepúlveda por su gran ayuda en la parte de Microscopía Electrónica.

Al M.V.Z. Aldo Bruno Alberti Navarro por ayudarme siempre en las cuestiones académicas, por seguir tan de cerca el desarrollo de mi carrera, de mi tesis y mi persona.

A mis compañeros del laboratorio: Pablo, Fernando, Miguel, Leonardo, Adelaida, Shaday, Daniel, Cristina por todas sus enseñanzas y los momentos divertidos que hemos compartido.

A mis compañeros de otros laboratorios: al Dr. Edgardo Escamilla, Martha, Lucha, Luz, Miguel, Ma. Esther, Héctor. Al Dr. Jesús Aguirre, Laura, Olivia, Rosa, Gabriela, Teresa.

A Alejandro Flores y Ramón Méndez por el apoyo que me han brindado.

Dedicatoria

A mis papás Rafael y Leticia por estar conmigo en todo momento.

A mis hermanos Rafa y Sandra, a mis cuñados Angélica y Luciano por su apoyo.

A la memoria de mis abuelos Rafael Montes de Oca M. y Ma. del Carmen Gómez G.

A toda mi familia.

A mis amigos Fabio, Salma, Sandra, José Antonio por hacer la vida divertida.

A mis compañeros de carrera, especialmente a Lucila, Claudia, Cristina, Verónica, Miguel,

Arturo E. por todos los momentos inolvidables que hemos compartido.

A mis maestros, sobre todo a aquellos que también han sido amigos.

A mis amigos que hoy ya no están entre nosotros.

Contenido.

I)	Lista de abreviaturas.....	i
II)	Resumen.....	iii
III)	Introducción.....	1
	1. Ciclos de vida de <i>N. crassa</i>	2
	2. Morfología.....	3
	3. Diferenciación celular de los microorganismos.....	3
	4. Importancia del peróxido de hidrógeno.....	6
	5. Características de las catalasas.....	7
	6. Localización de las catalasas.....	9
IV)	Objetivos.....	10
V)	Hipótesis.....	10
VI)	Material y Métodos.....	11
	1. Purificación de la catalasa-1.....	11
	2. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	13
	3. Actividad de catalasa.....	14
	4. Electroelución.....	15
	5. Determinación de proteína.....	15
	6. Glicosilación de la catalasa-1.....	15
	7. Producción de anticuerpos policlonales anti-catalasa-1..	16
	8. Titulación de los anticuerpos anti-catalasa-1.....	17
	9. Caracterización de los anticuerpos anti-Cat-1.....	20
	10. Obtención de los conidios.....	20
	11. Obtención de los micelios vegetativo, adherido y aéreo..	21
	12. Purificación de la catalasa-2	21
	13. Determinación de proteína.....	21
	14. Glicosilación de la catalasa-2.....	22
	15. Producción de anticuerpos policlonales anti-catalasa-2..	22
	16. Titulación de los anticuerpos anti-catalasa-2.....	22
	17. Caracterización de los anticuerpos anti-Cat-2.....	23
	18. Inmunolocalización de la Catalasa-1 y la Catalasa-2.....	23

	19. Cuantificación de la catalasa-1 y de la catalasa-2.....	24
VII)	Resultados.....	25
	1. Purificación de la catalasa-1.....	25
	2. Producción de anticuerpos anti-Cat-1.....	25
	3. Glicosilación de la catalasa-1.....	26
	4. Caracterización de los anticuerpos anti-catalasa-1.....	26
	5. Inmunolocalización cuantitativa de la catalasa-1.....	26
	6. Purificación de la catalasa-2.....	27
	7. Producción de anticuerpos anti-Cat-2.....	27
	8. Glicosilación de la catalasa-2.....	28
	9. Caracterización de los anticuerpos anti-catalasa-2.....	28
	10. Inmunolocalización cuantitativa de la catalasa-2.....	29
VIII)	Discusión.....	30
	1. Glicosilación de la catalasa.....	30
	2. Localización celular de las catalasas.....	32
IX)	Bibliografía.....	36
X)	Figuras.....	41
XI)	Tablas.....	52
XII)	Gráficas.....	54
	Lista de reactivos.....	56

I) Lista de Abreviaturas

μg	microgramos
μm	micrómetro
ASA	ácido 5-amino salicílico
BSA	albúmina sérica bovina
c.b.p.	cuanto baste para
Cat	catalasa
Da	daltones
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiamino teraacético
g	gramos
H_2O_2	peróxido de hidrógeno
HEPES	ácido N'-2-etanosulfónico
K_2HPO_4	fosfato de potasio
KCl	cloruro de potasio
kDa	kilodaltones
L	litros
LDS	lauril sulfato de litio
M	Molar
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	fosfato de sodio dodecahidratado
Na_2HPO_4	fosfato de sodio
NaCl	cloruro de sodio
nm	nanómetros
O_2	oxígeno

°C	grados Celsius
PBS	amortiguador de fosfatos salino
pH	potencial de hidrogeniones
PMSF	fenil metil sulfonil fluoruro
SDS	lauril sulfato de sodio
seg	segundos
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina
V	volts
x g	gravedades

II) Resumen

En nuestro laboratorio estamos interesados en la diferenciación celular y para entenderlo utilizamos como modelo experimental el hongo *Neurospora crassa*. En *N. crassa* se han identificado tres catalasas (Cat-1, Cat-2 y Cat-3). Para caracterizar estas catalasas se purificaron y se produjeron anticuerpos policlonales específicos contra la Cat-1 y la Cat-2. Los anticuerpos están dirigidos contra la parte proteica. Con estos anticuerpos hicimos la detección intracelular de las catalasas utilizando el método de oro coloidal. Las preparaciones se observaron en un microscopio electrónico de transmisión.

Los resultados muestran que la Cat-1 se localiza principalmente en la pared celular en los diferentes estados de diferenciación de *N. crassa*. Esto indica que la función principal de esta catalasa es de protección contra el peróxido de hidrógeno exógeno.

La Cat-2 también se encuentra en la pared celular de los diferentes estados de diferenciación. Sin embargo, una buena parte de la Cat-2 se encuentra en las mitocondrias.

III) Introducción

“Los procesos de diferenciación están relacionados con distintas formas de crecimiento, con la resistencia a condiciones ambientales adversas y con diferentes formas de reproducción. Analizando los sistemas de diferenciación estudiados, se ha visto que tienen características comunes o frecuentes.¹ Los microorganismos crecen en una gran variedad de condiciones ambientales, por ejemplo, en condiciones relativamente pobres de nutrimentos, temperaturas, salinidad y / o pH extremos, que son favorables para el crecimiento. Se induce su diferenciación sólo cuando los cambios ambientales no les permiten mantener un estado fisiológico de crecimiento estable. En estas condiciones, el proceso de diferenciación se inicia con un cambio metabólico brusco, en el que hay una disminución de la actividad biosintética, detención del proceso de replicación, un catabolismo general muy acentuado y la producción de varios metabolitos secundarios.¹ Las estructuras diferenciadas tienen un bajo contenido de agua y hay acumulación de iones y metabolitos, y son más resistentes a las condiciones ambientales extremas” (Hansberg y Aguirre, 1990).¹

Con base en estas características comunes en el proceso de diferenciación de los microorganismos, Hansberg y Aguirre en 1990 proponen una teoría en la que los estados de crecimiento y diferenciación son estados estables y entre cada uno de estos estados estables se da un estado inestable.²

“La célula en un estado fisiológico estable, mantiene una baja concentración intracelular de O_2 ($< 1 \times 10^{-5}$ M), limitando la entrada de éste a la célula y reduciéndolo. La reducción produce energía que es usada para mantener el crecimiento, por lo tanto, el crecimiento se puede ver como una consecuencia de la necesidad de la célula de reducir el O_2 ” (Hansberg y Aguirre, 1990).³

El consumo de O_2 es regulado por el poder reductor celular (XH). La relación entre la concentración intracelular del O_2 ($O_{2\text{ in}}$) y el poder reductor ($O_{2\text{ in}} / \text{XH}$) se mantiene constante en un estado estable.³

“Un estado diferenciado es una condición fisiológica de la célula en la que para mantener su estabilidad se aísla del O_2 ambiental. Un estado diferenciado es estable y puede presentar crecimiento. Sin embargo, por su aislamiento, los

estados diferenciados pueden producir sólo una cantidad limitada de energía, la cuál es usada parcialmente para mantenerse aislado del O₂ externo".³

En *N. crassa*, se ha visto que entre cada uno de los estados de diferenciación se genera un estado hiperoxidante, caracterizado por la producción de especies de oxígeno reactivas por arriba de la capacidad celular para neutralizarlas. Como consecuencia, se observa una pérdida del poder reductor celular, con excreción del disulfuro de glutatión; una oxidación de proteínas, que modifican la actividad de las enzimas y sus rutas metabólicas; consumo, oxidación e inducción de los carotenos; y la inducción de la actividad de la catalasa. La diferenciación celular se puede considerar como una respuesta celular para contender con un estado hiperoxidante.³

Utilizamos *Neurospora crassa* como modelo experimental, ya que presenta características favorables para esta investigación, como lo son la aptogenicidad, la facilidad para separar las diferentes estructuras celulares (hifas vegetativas, hifas adheridas, hifas aéreas y conidios) y obtenerlas en una cantidad adecuada para su estudio bioquímico.

1. Ciclos de vida de *Neurospora crassa*

Neurospora crassa tiene un ciclo de vida sexual y otro asexual. El ciclo **sexual** se inicia con la diferenciación de un ascogonio, que es un crecimiento de la hifa enrollada con una rama apical llamada tricogeno. Una hifa cubre el ascogonio formando un protoperitecio con el tricogeno expuesto. El tricogeno se une con un elemento espermático de sexo opuesto.^{4,5}

En la reproducción **asexual** se forman macroconidias y microconidias a partir de los conidióforos en las hifas aéreas. La macroconidia es multinucleada y germina eficientemente, por lo cuál, el hongo se reproduce. La microconidia es uninucleada y germina con poca eficiencia (1-20%).⁵

En la reproducción asexual de *N. crassa* ocurren tres pasos de diferenciación. Las hifas entran en contacto directo con el aire, se adhieren unas a otras. Esto ocurre en 40 min aproximadamente. Después de las hifas adheridas empiezan a crecer hifas aéreas, a las 2.5 horas de exposición al aire. Los conidios

se forman después de 9 horas de exposición al aire a partir de los conidióforos que se encuentran en la punta de la hifa aérea.⁶ Por lo tanto, en el proceso de conidiación de *N. crassa* se dan transiciones entre estados estables: de la hifa vegetativa a la hifa adherida, de la hifa adherida a la hifa aérea, y de la hifa aérea a los conidios⁶ (Fig.1).

2. Morfología

La hifa en *N. crassa*, que llega a medir hasta 30 μm , está segmentada por septos que la dividen en unidades similares. El septo tiene un poro central, que permite el paso del citoplasma y los organelos. Este poro es característico de los Ascomycetos y de los Deuteromycetos.⁴

Los macroconidios de *N. crassa* pueden medir hasta 10 μm y tienen características diferentes al micelio, relacionadas con su función. Son resistentes a la desecación, el calor, los ácidos y a la congelación. La pared celular de los conidios es una estructura muy resistente, que los hace capaz de soportar condiciones adversas.⁴

Los núcleos miden de 1-2 μm de diámetro, son pequeños comparados con los de animales y plantas. Como todos los núcleos, tienen una doble membrana con un espacio perinuclear de 10-70 nm entre ellas.⁵

Las mitocondrias son organelos de doble membrana, que dependiendo de su localización, estado de desarrollo del hongo y condiciones de crecimiento, varían en su forma, composición química y capacidad funcional. En cortes finos vistos al microscopio electrónico, se observan formas desde circulares, ovaladas, elongadas y algunas veces bifurcadas.⁵

La pared celular aísla a la célula del medio externo. Contiene factores de reconocimiento en su superficie que tienen que ver con la aglutinación y la reproducción.⁴

3. Diferenciación celular de los microorganismos

La capacidad de la mayoría de los microorganismos aerobios para reducir el O_2 generalmente es mayor que el O_2 que entra a la célula. Sin embargo, hay

condiciones en que el O_2 intracelular puede aumentar, por ejemplo, cuando aumenta la velocidad de entrada, o cuando el consumo del O_2 está limitado o deprimido y la entrada aumenta o se mantiene. Cuando la concentración intracelular del O_2 aumenta, es más probable que se generen especies de oxígeno reactivas. Estas especies son: el dioxígeno en singulete (1O_2) y las especies de oxígeno parcialmente reducido, como lo son el superóxido (O_2^-) y su forma protonada (HO_2), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($HO\cdot$).¹

El dioxígeno en singulete (1O_2) se forma cuando uno de los electrones sin aparear del dioxígeno absorbe energía y cambia el sentido de su giro. Se puede generar *in vivo* cuando se iluminan las células en presencia de oxígeno, debido a la captación de la energía luminosa por los pigmentos celulares, tales como la clorofila, las flavinas, el retinol y los hemos.⁷

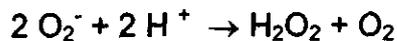
El superóxido (O_2^-) se forma cuando el oxígeno en su estado basal se reduce al aceptar un electrón. El superóxido es poco reactivo, pero su forma protonada (HO_2) es más activa y puede iniciar la peroxidación de lípidos. El superóxido se genera *in vivo* durante la respuesta de los fagocitos (neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos) al contacto con partículas extrañas a través de la NADPH oxidasa. También la xantina oxidasa produce O_2^- .⁷

Cuando el superóxido acepta un electrón, se forma el radical peróxido (O_2^{-2}) que en condiciones fisiológicas forma inmediatamente peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En solución acuosa, el superóxido puede dismutar y generar H_2O_2 y O_2 .⁸ El peróxido de hidrógeno se forma como producto de la reacción de varias oxidases, como lo son la urato oxidasa, glicolato oxidasa y también se genera por la dismutación del superóxido espontánea o por la superóxido dismutasa. El H_2O_2 puede difundir fácilmente y su toxicidad se debe posiblemente a la formación del radical hidroxilo.⁸

El radical hidroxilo ($OH\cdot$) se produce por medio de la reacción de Fenton en la que el H_2O_2 se reduce al aceptar un electrón de un metal de transición (cobre I, hierro II). Este es el radical más reactivo y reacciona rápidamente con azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, bases del DNA y ácidos orgánicos.⁸

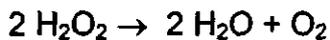
Hay varios mecanismos antioxidantes que sirven para contener la generación de estas especies de oxígeno reactivas:

- Las superóxido dismutasas (SOD), generalmente contienen cobre-zinc (Cu-ZnSOD) o manganeso (MnSOD). La CuZnSOD se encuentra prácticamente en todos los organismos eucariotes, también se ha encontrado en *E. coli*. La MnSOD se encuentra en las mitocondrias de los eucariotes y en los procariotes y la FeSOD se ha encontrado en algunas bacterias, algas y algunas plantas superiores, pero no se ha encontrado en animales. Las SOD catalizan la reacción:⁸



- Las catalasas son enzimas antioxidantes, tienen como función principal el desechar el H₂O₂ dismutando dos moléculas de peróxido de hidrógeno en dióxígeno y agua. Aunque la mayoría de las bacterias anaeróbicas no tienen catalasa, tienen una pseudocatalasa, enzimas que no tienen hemo pero que llevan a cabo la dismutación del H₂O₂. La bacteria anaerobia *Propionibacterium shermanii* sí tiene actividad de catalasa, al igual que la mayoría de las células aerobias.⁸

La reacción que catalizan es la siguiente:



- Las peroxidasas llevan a cabo la reacción general:⁸



donde SH₂ o SH representa un sustrato reducido.

Algunas de las peroxidasas son específicas en cuanto al sustrato que utilizan, pero también hay algunas no específicas, por lo que aceptan una gran variedad de moléculas como sustrato.⁸

- Las catalasas-peroxidasas, como su nombre lo indica, presentan actividad tanto de catalasa como de peroxidasa.

Hay también algunos mecanismos no enzimáticos que sirven para contender con un estado hiperoxidante, estos son:

1.- Compuestos liposolubles:

- La vitamina E (tocoferol) es el antioxidante más ampliamente distribuido en la naturaleza. Este sirve como protección contra la peroxidación de lípidos de las membranas mediante su reacción con radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) y alcoxilo ($\text{RO}\cdot$).⁸ La vitamina E reacciona y desactiva el oxígeno en singulete.

- Los carotenos protegen a los lípidos de la peroxidación atrapando y desactivando al oxígeno en singulete.⁹

- La bilirrubina también desactiva al oxígeno en singulete y reacciona con el radical peroxilo.⁹

2.- Compuestos hidrosolubles:

- La vitamina C (ácido ascórbico), además de su función como cofactor de varias enzimas, reacciona directamente con el superóxido y el radical hidroxilo y también con varios hidroperóxidos lipídicos.⁹

El ascorbato puede actuar como prooxidante al reducir el Fe(III) a Fe(II) y si hay H_2O_2 presente, se puede formar hidroxilo a través de la reacción de Fenton.⁸

- El glutatión, además de ser sustrato de la glutatión peroxidasa, reacciona con el radical hidroxilo y con el oxígeno en singulete y participa como cofactor de varias enzimas.⁸

- El ácido úrico es un poderoso atrapador de radicales hidroxilo.⁸ También, parece evitar la oxidación de la vitamina C, probablemente debido a que es capaz de formar complejos con metales de transición como el fierro y el cobre.¹⁰

4. Importancia del peróxido de hidrógeno

Cualquier sistema biológico que genere O_2^- produce peróxido de hidrógeno. La producción *in vitro* del H_2O_2 a través de la dismutación del O_2^- se observa

frecuentemente en las preparaciones de mitocondrias y de los microsomas.¹¹ El peróxido de hidrógeno puede inactivar algunas enzimas directamente por oxidación del grupo tiol (-SH) como en la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, una enzima de la vía de la glucólisis. Por eso, ante la exposición de las células a una dosis alta de peróxido de hidrógeno puede causar falta de ATP por inhibición de la glucólisis.¹¹

El H₂O₂ puede cruzar las membranas celulares rápidamente, a diferencia del O₂⁻ que por estar cargado, no puede hacerlo. Una vez dentro de la célula, el H₂O₂ puede reaccionar con el Fe²⁺ y Cu⁺, formando el radical hidroxilo, que es muy reactivo y puede dar origen a muchos de los efectos tóxicos del H₂O₂. Esta reacción se conoce como la reacción de Fenton.¹¹

El H₂O₂ intracelular proviene fundamentalmente de la dismutación espontánea o enzimática del radical superóxido. La enzima SOD dismuta el radical superóxido a peróxido de hidrógeno. La cadena de transporte de electrones de la mitocondria es una fuente principal del H₂O₂ a través de la producción del superóxido.¹¹

Otra fuente es la NADPH oxidasa de los fagocitos. La oxidasa reduce el O₂ con NADPH y produce superóxido. Por otro lado, la xantina oxidasa y la xantina deshidrogenasa producen superóxido y peróxido de hidrógeno, respectivamente.¹¹

5. Características de las catalasas

En 1936, Stern mostró que la catalasa contiene protoporfirina IX como el grupo prostético de la enzima. Desde entonces, se ha encontrado que las catalasas de varios organismos estudiados contienen este tipo de hemo.¹²

La mayoría de las catalasas se conforman de cuatro subunidades y contienen cuatro grupos prostéticos por molécula.¹² La enzima nativa es de color verde y tiene dos picos de absorción a 400 nm y a 590 nm correspondientes al grupo hemo y al complejo I, respectivamente.¹²

En *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* se encuentran dos catalasas. La actividad de catalasas aumenta durante la iniciación de la esporulación de *B. subtilis* y en la fase de crecimiento preestacionario en *E. coli*. La catalasa-2 es

específica para las esporas en *B. subtilis* y la catalasa HPII es específica de la fase estacionaria en *E. coli*.² *Klebsiella pneumoniae* presenta tres tipos de catalasa denominadas KpA, KpCP y KpT. La KpA y la KpT presentan actividad de catalasa típica, mientras que la KpCP presenta actividad de catalasa-peroxidasa.¹³

En los animales, la catalasa está presente en todos los órganos y está especialmente concentrada en el hígado y los eritrocitos; en los órganos como el cerebro, corazón y músculo esquelético la concentración es baja.¹² Las catalasas de los animales tienen una baja afinidad por el H₂O₂, siendo de 1 molar y están localizadas en los peroxisomas.¹⁴ Mediante la técnica de transferencia de genes, se ha determinado que la catalasa-peroxidasa de *Synechococcus* se localiza en el citoplasma cuando el gen es expresado en células de cobayo.¹⁴

En las hojas de *Nicotiana sylvestris* existen dos tipos de catalasa, una catalasa típica (CAT-1) y una catalasa-peroxidasa (CAT-3).¹⁵ En *Zea mays* se han encontrado tres catalasas distintas (CAT-1, CAT-2 y CAT-3). La CAT-2 se encuentra en las células del haz de la hoja y es una catalasa típica. La CAT-3 se encuentra en las células mesófilas y presenta actividad de catalasa-peroxidasa.¹⁵

Aspergillus nidulans tiene tres catalasas, la CatA, la CatB y la CatC. La CatA se expresa durante la conidiación y es la principal catalasa en la conidia. La CatB se presenta durante el crecimiento y se incrementa a altos niveles durante la conidiación.² La CatC se ha encontrado en micelio a las 48 horas de crecimiento.¹⁶

Se ha descrito una catalasa de *N. crassa*, con una masa molecular de 320 kDa, aproximadamente, y que no contiene protoporfirina como grupo prostético.¹⁷

En nuestro laboratorio se hizo un ensayo de entrecruzamiento de la catalasa-1 (Cat-1) con glutaraldehído^{18,19,20}. Los resultados muestran que la Cat-1 es un homotetrámero con un PM de 88.6 kDa para el monómero (Fig.2).

En un zimograma de un extracto de *N. crassa* se observan diferentes bandas de actividad. Estas bandas corresponden a dos tipos de catalasa: catalasa-1 (Cat-1) y catalasa-2 (Cat-2) y sus formas modificadas por el oxígeno en singulete.²¹ La Cat-1 presenta cinco confórmers: Cat-1a (no modificada), Cat-1b, Cat-1c, Cat-1d (parcialmente modificados) y Cat-1e (con los cuatro monómeros modificados).

La Cat-1 se induce durante la conidiación y en diferentes condiciones de tensión; la Cat-2 se presenta en el micelio y en los conidios y en condiciones de tensión calórica.²² Los ensayos de cinética indican que la Cat-2 posiblemente sea una catalasa-peroxidasa (Díaz, comunicación personal). Ultimamente, se ha observado una tercera catalasa (Cat-3) que presenta la misma movilidad electroforética que la Cat-1c. Esta Cat-3 se está caracterizando en nuestro laboratorio.

Es importante destacar que la actividad de la catalasa se incrementa durante la diferenciación celular en varios microorganismos y que una catalasa se acumula en un nivel alto en la célula diferenciada.²

6. Localización de las catalasas

La actividad de la catalasa de los tejidos animales y las plantas está asociada generalmente con los organelos subcelulares conocidos como peroxisomas. En el hígado de la rata y del ratón los monómeros de la catalasa se sintetizan en los polirribosomas libres. Los monómeros entran en los peroxisomas y ahí se les añade el grupo hemo y adquieren la forma tetramérica.²³ Sin embargo, existen algunas catalasas no peroxisomales en hígado de algunos animales como en el caso del cobayo. Otros reportes mencionan la existencia de catalasas citosólicas en varias especies.²³ Se ha reportado que las mitocondrias, los cloroplastos y el retículo endoplásmico contienen poca actividad de catalasa.⁸

En *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito una catalasa peroxisomal (catalasa-A) y otra citosólica (catalasa-T).²⁴

Fowler menciona que hay por lo menos dos catalasas distintas en *Aspergillus niger*. La catA posiblemente tiene una localización peroxisomal mientras que la catR posiblemente sea una proteína secretada y localizada en la pared celular.²⁴ En *Aspergillus nidulans* se ha observado que la CatA²⁵ se localiza principalmente en la pared celular de los conidios y la CatB¹⁶ en la pared celular del micelio.

En *Claviceps purpurea* mediante la técnica de Diaminobencidina, localizaron la actividad de catalasa en la pared celular de las hifas. La actividad se acumula en el espacio periplásmico y en la superficie de las hifas.²⁶ Mediante la técnica de proteína A oro localizaron la catalasa principalmente en la pared celular y también la localizaron en el citoplasma.²⁶

Las catalasas de rata, humanos y la catalasa-T de levaduras se localizan en los peroxisomas por su secuencia en el C-terminal.²⁶

En *N. crassa* no se ha reportado la localización de las catalasas.

IV) Objetivos

- Purificar la Cat-1 y la Cat-2.
- Producir anticuerpos policlonales específicos contra la Cat-1, contra la Cat-2 para poder utilizarlos como herramienta de localización de estas catalasas.
- Caracterizar cada uno de los anticuerpos.
- Determinar la localización intracelular de la Cat-1 y la Cat-2 durante el ciclo de crecimiento y diferenciación de *N. crassa*.
- Cuantificar la Cat-1 y la Cat-2 en las estructuras de cada estado de crecimiento y diferenciación de *N. crassa*.

V) Hipótesis

La Cat-1 y la Cat-2 se encuentran localizadas en el citoplasma y en las diferentes estructuras de cada estado de crecimiento y diferenciación, ya que se obtienen a partir de los extractos sin necesidad de utilizar detergentes o solventes que rompan las estructuras celulares.

VI) Material y Métodos

1. Purificación de la catalasa-1

Se inoculó un medio de cultivo con *N. crassa* (cepa silvestre 74A) a una concentración de 1×10^6 conidios / ml. Se sembraron 30 matraces de 500 ml conteniendo 100 ml de medio mínimo de Vogel para los cultivos sólidos con Agar 2 % / Sacarosa 1.5%.²⁷ Los cultivos se incubaron por tres días a 30°C en la oscuridad y dos días a 24°C en la luz.

Se cosechó el micelio aéreo y los conidios directamente en acetona, agitando para desprenderlos. Posteriormente se filtró la suspensión a través de papel Whatman No.1. La extracción con acetona se repitió una segunda vez para obtener la mayor cantidad posible de material.

Se homogeneizaron 2 g de polvos de acetona en 40 ml de Solución H* en un vaso del homogenizador Bead Beater con la mitad del volumen de perlas de vidrio (0.3-0.5 mm de diámetro). El vaso se colocó en una licuadora y se agitó a la máxima velocidad durante 20 seg, tres veces, con intervalos de 20 seg. El homogeneizado (A1) se centrifugó en una centrífuga refrigerada (Hettich, Universal 16R), 5 min, 800 x g, a 4°C. Se separó el sobrenadante (S1) y el precipitado (P1). A este último se le añadió 20 ml de Solución I*, se volvió a agitar 3 x 20 seg y se centrifugó, resultando un sobrenadante (S2) y un precipitado (P2). Se añadió 10 ml de Solución I* a la pastilla P2, se volvió a agitar 3 x 20 seg y de nuevo se centrifugó. Se mezclaron los tres sobrenadantes (S1 + S2 + S3), se congelaron y descongelaron 2 veces y se centrifugaron 10 min, 800 x g. El sobrenadante (S4) se precipitó con 2 volúmenes de acetona, a -20°C, durante una noche. La suspensión se centrifugó, 10 min, 800 x g, desechando el sobrenadante de acetona. El precipitado (P6) se resuspendió en 10 ml de Solución J*, se centrifugó 10 min x 3000 rpm y se repitió el lavado de la pastilla una vez más.

Los sobrenadantes S5, S6 y S7 se juntaron y se centrifugaron 10 min x 3000 rpm. El sobrenadante (S8) se precipitó con 35% de sulfato de amonio, lentamente y con agitación moderada de manera que éste entrara en solución conforme se agregó. Una vez que todo el sulfato de amonio entró en solución, se

dejó en agitación durante una hora. La solución se centrifugó 10 min a 800 x g y la pastilla (S35) se resuspendió en 3 ml de una mezcla 50 mM de Na₂HPO₄ y K₂HPO₄ / sulfato de amonio 0.5 M y se agregaron 5 ml de fenil sefarosa (Phenyl-Sepharosa CL-4B Pharmacia) equilibrada en la misma solución. Se dejó agitando 30 min con un agitador magnético a baja velocidad y posteriormente se dejó asentar la resina, se eliminó el sobrenadante y luego se lavó la suspensión de la resina con 30 ml de 50 mM de Na₂HPO₄ y K₂HPO₄ / sulfato de amonio 0.5 M durante 30 min, agitando a baja velocidad, se dejó asentar la resina nuevamente y se eliminó el sobrenadante.

Se virtió la sefarosa en una columna de 5 ml, se dejó asentar y luego se dejó salir la solución colectando alícuotas de 1 ml.

La columna se eluyó con 20 ml de una solución de Na₂HPO₄ y K₂HPO₄ 50 mM / sulfato de amonio 0.5 M, luego con 20 ml de Na₂HPO₄ y K₂HPO₄ 50 mM, después con 20 ml de Na₂HPO₄ y K₂HPO₄ 10 mM y finalmente con 20 ml de agua, colectando fracciones de 1 ml.

Se determinó la actividad de catalasa de las fracciones colectadas y se juntaron las fracciones con mayor actividad. La catalasa se concentró por filtración a través de una membrana de exclusión de corte a 30 kDa (YM 30 Amicon).

Se analizó la pureza de la Cat-1 y la presencia de los confómeros (Cat-1a – Cat-1e) en las diferentes fracciones mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes.

Se tomaron alícuotas de 0.2 ml y se guardaron junto con las demás fracciones a 4°C.

Soluciones:	<u>Solución H*:</u>	<u>Solución I*:</u>	<u>Solución J*:</u>
Boratos	10 mM	10 mM	10 mM
KCl	50 mM	50 mM	50 mM
Manitol	20 mM	20 mM	20 mM
LDS	2 %		
PMSF	0.5 mM	0.5 mM	
EDTA	1.0 mM	1.0 mM	
DTT	0.2 mM	0.2 mM	

ASA

1.0 mM

2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se analizó la actividad de los conformeros de la catalasa mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% en condiciones no desnaturizantes. Los geles se corrieron en unas cámaras mini-gel de Bio-Rad, con separadores de 0.75 mm.

El gel se preparó de la siguiente forma:

	Inferior	Superior
Acrilamida*	1.33 ml	283.6 μ l
Tris 2 M, pH 8.8	1.083 ml	283.6 μ l
Agua	2.583 ml	1.1 ml
Persulfato de amonio 10%	12.5 μ l	8.3 μ l
Temed	8.3 μ l	3.33 μ l

* Acrilamida al 30% - Bisacrilamida al 0.8%

El amortiguador de corrida contenía Glicina 1.44 % y Trizma base 0.3%.

El amortiguador de entrada para la muestra contenía una concentración final de 2x y contenía Glicerol 10 %, Trizma base 5 % (tomado de una solución concentrada 2 M) y Azul de Bromofenol 0.2 %.

El gel se corrió durante 2.5 horas a 150 V y se reveló por actividad de catalasa según el método descrito por Gregory y Fridovich (1974) como se describe a continuación. El gel se fijó durante 2 minutos con metanol al 5%, se lavó 3 veces con agua y se incubó durante 5 minutos con 50 ml de H₂O₂ 10 mM. Luego se lavó una vez más con agua y se reveló con 5 ml de ferricianuro de potasio (1 g / 50 ml agua) y 5 ml de cloruro férrico (1 g / 50 ml agua) hasta que aparecieron las bandas de actividad y se paró la reacción con ácido acético al 10%.

La electroforesis en condiciones desnaturizantes se hizo según el método de Laemmli (1970).²⁸ Se usó una cámara mini gel de Bio Rad.

El gel se preparó de la siguiente manera:

	Inferior		Superior
Acrilamida*	1.32 ml		216.5 μ l
Tris 2M, pH 8.8	864 μ l	(pH 6.8)	283 μ l
Agua	1.72 ml		1.15 ml
SDS 10%	40 μ l		16.6 μ l
Persulfato de amonio 10%	10 μ l		8.3 μ l
Temed	6.6 μ l		3.3 μ l

* Acrilamida al 30% - Bisacrilamida al 0.8%

El amortiguador de corrida contenía lo mismo que el del gel nativo, sólo que se le adicionó 0.1% de SDS. A las muestras se les agregó una solución con una concentración final de 2x que contenía:

β -Mercaptoetanol al 5%

Amortiguador 4% (glicerol 10%, SDS 4%, Tris al 5% tomado de una solución concentrada 2 M y Azul de Bromofenol al 0.02%).

El gel se corrió durante 45 min a 200 V y después se tiñó con una solución de Coomasie que contenía:

Azul de Coomasie	240 mg
Metanol	120 ml
Acido acético	40 ml
Agua destilada c.b.p.	500 ml

Esta solución se pasó a través de un papel filtro Whatman N° 4 y se guardó a temperatura ambiente.

3. Actividad de catalasa

La actividad de catalasa se determinó usando un electrodo Clark, cubierto con una

membrana de celofán, conectado a un oxímetro* y a un graficador (Río *et al* 1977).²⁹ La determinación se llevó a cabo en una cámara con 2 ml de un amortiguador de Na₂HPO₄ y K₂HPO₄ 50 mM, pH 7.8 y 10 mM de H₂O₂. La reacción se inició al agregar la proteína.

La actividad se determinó mediante la fórmula:

$$(0.5 / m) \times 15 = X$$

$$(X) \cdot \text{vol inyectado} / 4$$

m= pendiente en centímetros. Una unidad de actividad enzimática es la cantidad de catalasa que transforma 1 μmol de peróxido de hidrógeno por minuto a 25°C.

4. Electroelución

La proteína se electroeluyó para garantizar su pureza. Primero se corrió un gel nativo de un sólo pozo con 800 μg de proteína. Para localizar la catalasa en el gel, cortamos una tira longitudinal y la teñimos para actividad de catalasa. Con la ayuda de la tira, se localizó la banda en la parte del gel no teñido y se cortó. Una vez separada la banda de la catalasa, se dividió el gel en fracciones pequeñas que se colocaron en los pozos de electroelución con amortiguador que contenía Glicina 0.14% y Trizma base 0.03%. Se utilizó amortiguador que contenía Glicina 1.44% y Trizma base 0.3% en el resto de la cámara de electroelución (Little Blue Tank, ISCO).³⁰ La electroelución se hizo durante 3 horas a 3 Watts.

5. Determinación de proteína

Se hizo la determinación de la Cat-1 en un espectrofotómetro Beckman (DU 650) por la absorbencia a 400 nm, que es la longitud a la que absorbe el grupo hemo. Una absorbencia de 0.05 corresponde a 73.3 μg de catalasa / ml.

6. Glicosilación de la catalasa-1

Se hizo el ensayo de glicosilación de la Cat-1 de *N. crassa* con anticuerpos producidos contra una Cat-1 a la cuál no se le quitaron los carbohidratos. Se corrió un gel tipo Laemmli de un pozo que contenía 1 mg de extracto de micelio de 20

* YSI modelo 53 Yellow Spring Instruments. Co. Inc.

horas de crecimiento y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Se le dió un tratamiento con peryodato de sodio a la membrana de nitrocelulosa¹ y se hizo un "Western Blot"². Como control se hicieron las mismas incubaciones pero sin peryodato de sodio. Se manejó una dilución del suero de 1:40.

Se produjeron otros anticuerpos contra una Cat-1 tratada con peryodato de sodio para remover los carbohidratos. Se precipitó la catalasa con acetona y se resuspendió en un amortiguador de acetato de sodio 50 mM, pH 4.5, conteniendo peryodato de sodio 10 mM. Incubamos la enzima 24 horas en la obscuridad a temperatura ambiente y al terminar, se paró la reacción con etilenglicol 1 M. Después se dializó la enzima toda la noche contra un amortiguador de fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0, a 4°C.³¹ Con esta enzima se inyectó un conejo después de haberlo inmunizado previamente con una Cat-1 que no había sido tratada con peryodato de sodio.

7. Producción de anticuerpos policlonales anti-catalasa-1

Utilizamos un conejo de la raza Nueva Zelanda blanco para la producción de los anticuerpos. Se inoculó por la vía intradérmica la catalasa pura nativa. Tomamos una muestra de sangre de la vena marginal de una oreja para obtener el suero pre-inmune y usarlo como control. El suero se obtuvo dejando cuagular la sangre y centrifugándolo a 5000 x g durante 10 minutos a 4°C. El suero se guardó a -80°C.³²

Para la primera inoculación se trituraron 100 µg de Cat-1 contenida en un gel de poliacrilamida junto con 1 ml de Adyuvante Completo de Freund y se inyectó la mezcla en el dorso del conejo.

A los 15 días se hizo el primer sangrado y la titulación de los anticuerpos. Ese mismo día se aplicó el primer refuerzo con 50 µg de catalasa nativa electroeluída de un gel, junto con amortiguador de fosfatos salino (PBS) y 1 ml de Adyuvante Incompleto de Freund. Después de 10 días se hizo otro sangrado para titular los anticuerpos y se aplicó otro refuerzo.

¹ Los detalles del método de transferencia y del tratamiento con peryodato se describen en la sección de Caracterización de los anticuerpos anti Cat-1.

² Los detalles del método se describen en la sección de Titulación de los anticuerpos anti-catalasa 1.

Después de tres inoculaciones, se sangró a blanco por punción cardíaca para obtener el suero hiperinmune.

El PBS se obtuvo a partir de una solución concentrada de PBS 10x que contenía:

NaCl	80	g
KCl	2	g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	28.98	g
KH ₂ PO ₄	2	g
Na ₂ HPO ₄	11.49	g
Agua destilada c.b.p.	1	L

La solución de PBS 10x se guardó a temperatura ambiente.

La solución PBS se guardó a 4°C.

8. Titulación de los anticuerpos anti catalasa-1

Para hacer las titulaciones, utilizamos la técnica de “Western Blotting” y membranas de nitrocelulosa de 0.45 μm ^{33,34} (Bio-Rad) en una cámara Hoefer. Se transfirieron a una membrana las proteínas separadas por electroforesis en un gel en condiciones desnaturalizantes. También se transfirieron en una membrana las proteínas separadas por electroforesis de un gel en condiciones no desnaturalizantes para ver si los anticuerpos reconocen el tetrámero de la catalasa. Los extractos transferidos a la membrana de nitrocelulosa provinieron de un micelio de 20 horas de crecimiento, de un micelio sometido a tensión calórica y de conidios.

Para el extracto del micelio en crecimiento, se hizo crecer *N. crassa* en un matraz Fernback con 700 ml de medio de cultivo Vogel / sacarosa inoculando 100,000 conidios / ml. Después de 20 horas de cultivo en una incubadora con agitación a 54 x g y a 30°C, se colectó el micelio por filtración y se hicieron polvos de acetona. Estos polvos se guardaron a -20°C. El extracto se hizo rompiendo los polvos de acetona con perlas de vidrio y una solución Hepes que contenía:

Hepes	238	mg
DTT	7.8	mg
Desferal	3.3	mg
PMSF*	250	μl
Agua destilada c.b.p.	50	ml

*De una preparación concentrada 0.2 M que se agrega al momento de utilizar la solución Hepes.

La solución de Hepes se guardó a 4°C.

El extracto se observó al microscopio óptico para corroborar la ruptura completa del micelio. El micelio se centrifugó a 11,260 x g durante 5 minutos y al sobrenadante se le determinó la proteína por el método de Bradford (1976).³⁵ Para la separación por electroforesis, se cargó 1 mg de proteína del extracto en un gel de poliacrilamida de un sólo pozo.

El extracto del micelio sometido a tensión calórica se preparó de la misma manera que el extracto de 20 horas pero, al término de la incubación, se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 4 litros, se le agregó 2100 ml de medio fresco y se dividió pasando 250 ml a matraces de 1 litro. Estos matraces se incubaron durante 2 horas a 48°C agitándolos a 200 rpm. El micelio se colectó por filtración y se hicieron polvos de acetona. Los polvos se rompieron igual que el extracto de 20 horas. Se determinó la proteína del extracto por el método de Bradford para cargar 1 mg de proteína del extracto en un gel de poliacrilamida de un sólo pozo.

Para hacer el extracto de conidios se descongelaron rápidamente los conidios y se centrifugaron a 11,260 x g durante 5 minutos. A la pastilla de conidios se le agregó una solución hepes y se homogeneizó agitando con perlas de vidrio. Una vez corroborando al microscopio óptico la ruptura de los conidios, se centrifugó el extracto y se le determinó la proteína por el método de Bradford para cargar 1 mg de proteína de extracto en un gel de poliacrilamida de un sólo pozo.

Después de correr los extractos en geles de poliacrilamida, se hizo la transferencia a las membranas de nitrocelulosa durante 3 horas a 30 Volts, utilizando un amortiguador que contenía:

Tris	6.05	g
Glicina	28.97	g
Metanol	400	ml
Agua destilada c.b.p.	2	L

Ajustando a un pH de 8.3.

Esta solución se guardó a 4°C.

Al terminar la transferencia, teñimos el gel de poliacrilamida con azul de Coomassie para corroborar la transferencia de las proteínas del gel a las membranas y la membrana se tiñó con Rojo Ponceau. Las membranas se lavaron con PBS y después se fijó la proteína utilizando glutaraldehído al 0.5% en PBS durante 15 min. Antes de incubar con el suero, las membranas, con las proteínas transferidas de un gel en condiciones desnaturalizantes, se bloquearon con una solución de PBS / Tween 20 al 0.3% / leche semidescremada al 5%.³⁶ Las membranas con las proteínas transferidas de un gel nativo, no se trataron con glutaraldehído y se utilizó albúmina 2% en PBS para bloquear los sitios inespecíficos. Incubamos las membranas con el suero a 37°C durante 2 horas, en una solución de PBS / Tween 20 al 0.3% / leche al 0.2% o PBS / BSA 1 mg / ml, dependiendo de la membrana. Después se lavaron las membranas por 5 minutos 4 veces con PBS / Tween 20 al 0.3% para las membranas de gel tipo Laemmli y con PBS para las membranas de gel nativo.

Posteriormente, incubamos las membranas con un segundo anticuerpo, que está acoplado a una peroxidasa (Sigma Immuno Chemicals Anti-Rabbit IgG, whole molecule, peroxidase conjugate), a una dilución de 1:500 durante 1 hora a 37°C. El segundo anticuerpo anti-conejo reconoce el anticuerpo de conejo en contra de la catalasa. Al terminar esta incubación, lavamos tres veces las membranas con PBS / Tween 20 al 0.3% y después dos veces con PBS y revelamos la actividad de peroxidasa con 4-cloronaftol. Después de esto, se enjuagaron las membranas con agua destilada. En las membranas de gel nativo no utilizamos Tween 20.

El 4-cloronaftol se preparó de la siguiente manera:

4-cloronaftol*	2	ml
PBS	10	ml
H ₂ O ₂ al 30%	10	µl

Esta solución se preparó inmediatamente antes de ser utilizada.

*3 mg de 4-cloronaftol / ml de metanol. Esta solución se guardó a -20°C.

9. Caracterización de los anticuerpos anti-Cat-1

Se corrió una electroforesis en un gel en condiciones desnaturalizantes y en un gel en condiciones no desnaturalizantes con los extractos de micelio de *Aspergillus nidulans*, de conidios de *A. nidulans*, de conidios de *Neurospora crassa*, de hígado de rata y con la catalasa bovina.

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron de los geles a las membranas de nitrocelulosa, se bloquearon y se lavaron como se describió anteriormente. Luego se remojaron las membranas con una solución de acetato de sodio 50 mM, pH 4.5 y se incubaron en esta misma solución con 20 mM de peryodato de sodio durante 1 hora a temperatura ambiente en la obscuridad. Al terminar, se enjuagaron las membranas con la misma solución de acetatos y se incubó a 4°C en amortiguador de fosfato de sodio 100 mM, pH 7.5, 1% glicina durante toda la noche. Se lavaron las membranas con PBS / Tween 20 al 0.3% y posteriormente se hizo el "Western Blot" utilizando los anticuerpos a una dilución de 1:1,000.

Como control, se hizo el mismo procedimiento pero sin agregar peryodato de sodio.

10. Obtención de los conidios

Se hizo crecer *N. crassa* en cultivos sólidos de medio mínimo de Vogel con Agar al 2% durante dos días a 30°C en obscuridad y tres días a 24°C en luz. Los conidios se recolectaron agitando los matraces con 100 ml de agua y pasando la suspensión de un matraz a otro. La suspensión se filtró a través de una gasa en

un embudo. Los conidios se colectaron a 4°C y se alicuotaron en tubos Eppendorf. Las alícuotas se pusieron durante una hora a -20°C y después se guardaron a -80°C.

11. Obtención de los micelios vegetativo, adherido y aéreo

Se hizo crecer *N. crassa* en un matraz Fernback con 700 ml de medio líquido de Vogel con 1.5 % de sacarosa, inoculando 100,000 conidias / ml. Se dejó crecer durante 20 horas en una incubadora a 30°C con agitación a 54 x g. Una vez terminada la incubación, se filtraron 50 ml de cultivo por un sistema Millipore con papel Whatman Nº 4. Justo antes de que todo el cultivo se terminara de filtrar, se lavó el micelio con agua destilada, moviendo el sistema de filtración para resuspender el micelio. Antes de acabar de filtrar, se lavó el micelio con 250 ml de solución de fosfato de potasio 30 mM, pH 6.1, resuspendiendo el micelio y después dejando asentar el micelio de una manera homogénea aplicando vacío para eliminar el exceso de agua y que sólo quedara húmeda la masa micelial. Después, se pasó el micelio a una caja Petri con 4 papeles Whatman húmedos y se incubó durante 9 horas a 24°C con 75% de humedad relativa. Después de la incubación, se desprendió con una espátula fina el micelio vegetativo, el adherido y el aéreo y éstos se pasaron a tubos Eppendorf y se guardaron a -20°C.

12. Purificación de la Catalasa-2

La catalasa-2 se purificó a partir de la fracción de catalasa-1 que se eluyó de la columna de fenil sefarosa con amortiguador de fosfatos 10 mM. Esta fracción se concentró, se cargó por proteína en un gel y se corrió una electroforesis en condiciones no desnaturizantes. Se cortó la banda correspondiente a la catalasa 2 y se electroeluyó.

13. Determinación de proteína

La cantidad de catalasa-2 se determinó por su absorbencia a 400 nm.

14. Glicosilación de la catalasa-2

Se utilizó el mismo método para remover los carbohidratos de la Cat-2 que el utilizado para la Cat-1, a partir de la quinta inmunización al conejo.

Se hizo el ensayo de glicosilación de la Cat-2 con los anticuerpos específicos de esta catalasa, dando un tratamiento con peryodato de sodio³ a la membrana de nitrocelulosa con un extracto de 20 horas sometido a tensión calórica. Se hizo un control sin darle tratamiento con peryodato de sodio a la membrana de nitrocelulosa. Para el "Western Blot", se usaron los anticuerpos a una dilución de 1:500 con un suero obtenido de la catalasa-2 no tratada.

15. Producción de anticuerpos policlonales anti-catalasa-2

Se utilizó un conejo de la raza Nueva Zelanda Blanco para producir los anticuerpos. El calendario para la producción del suero hiperinmune fué el mismo que para la producción de los anticuerpos anti-catalasa 1, dando 6 Inoculaciones de la catalasa-2. El conejo se sangró a blanco por punción cardiaca para obtener el suero hiperinmune.

16. Titulación de los anticuerpos anti-catalasa-2

Para hacer las titulaciones, utilizamos la técnica de "Western Blot". Los extractos transferidos a las membranas de nitrocelulosa provinieron de un micelio de 20 horas de crecimiento sometido a tensión calórica. Las proteínas se separaron por electroforesis en un gel en condiciones desnaturalizantes. También se transfirieron las proteínas separadas por electroforesis en un gel en condiciones no desnaturalizantes. Se fijaron las proteínas con glutaraldehido al 0.5% en PBS y se bloquearon las membranas de nitrocelulosa con PBS / Tween 20 al 0.3%/leche semidescremada al 5%. El suero se diluyó en PBS / Tween 20 al 0.3%/ leche semidescremada al 0.2%.

³ Los detalles de esta técnica se encuentran en la sección de Glicosilación de la catalasa-1.

17. Caracterización de los anticuerpos anti-Cat-2

Se corrió una electroforesis en un gel en condiciones desnaturalizantes y en un gel en condiciones no desnaturalizantes con los extractos de micelio de *Aspergillus nidulans*, de conidios de *Neurospora crassa*, de hígado de rata y con la catalasa bovina.

Se hizo el mismo procedimiento de caracterización que el utilizado para los anticuerpos anti Cat-1. El suero se incubó a una dilución 1:4,000 para el gel en condiciones desnaturalizantes y una dilución 1:400 para el gel en condiciones no desnaturalizantes.

Como control, se hizo el mismo procedimiento pero sin agregar peryodato de sodio.

18. Inmunolocalización de la Catalasa-1 y la Catalasa-2

Para hacer la inmunolocalización, se usó el método de inmunomarcaje utilizando proteína A oro de 5 nm.

Las estructuras celulares de los micelios vegetativo, adherido, aéreo y los conidios se fijaron durante 1 hora con glutaraldehído al 0.5% en amortiguador de cacodilato 0.1 M a un pH 7.2 a temperatura ambiente.³⁷ Después de esto, se centrifugaron durante 5 minutos a 4,380 x g. El material se resuspendió en cacodilato 0.1 M, pH 7.2, se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Este paso se hizo dos veces. El material se resuspendió nuevamente en solución de cacodilato y se incubó durante una noche. Se centrifugó y se deshidrató el material durante 15 minutos con etanol al 30% con el material resuspendido, se centrifugó y deshidrató nuevamente con etanol al 40%, 50%, 60%, 70%, durante 15 minutos cada uno. Se repitió dos veces más la deshidratación con etanol al 70%. Se centrifugó y desechó el sobrenadante. El material se infiltró en resina LR White:etanol al 70% (2:1) durante toda la noche.

Después de centrifugar durante 5 minutos a 4,380 x g, se le añadió al material una resina LR White, incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente para después centrifugar. Las muestras se pasaron a cápsulas de gelatina y se les añadió resina. Se guardaron las cápsulas durante 48 horas a

60°C para que polimerizara la resina. Después se quitó la cápsula de gelatina para hacer cortes de 90 nm en un ultramicrotomo Leica Ultracut R. Los cortes se montaron en rejillas de níquel de 300 "mesh" cubiertas con "formvar".

Los cortes se bloquearon durante 5 minutos con PBS/leche semidescremada al 3%. Al terminar el bloqueo, se enjuagaron las rejillas con PBS. A partir de este paso, se utilizó una cámara húmeda. Después se incubaron las rejillas con el suero concentrado, durante 2 horas a 4°C. Al terminar, se enjuagaron con PBS y se incubaron las rejillas durante 1 hora con proteína A oro de 5 nm, a 4°C. Se enjuagaron con PBS y posteriormente con agua.³⁸

Para localizar la Cat-2 en el micelio aéreo, se utilizó proteína A oro de 10 nm.

Los cortes se tiñeron incubándolos durante 15 minutos en acetato de uranilo al 2% en un portaobjetos excavado. Al terminar, se enjuagaron con agua y los cortes se incubaron durante 5 minutos con citrato de plomo según Reynolds (1963)³⁹ y se volvieron a enjuagar con agua para observar al microscopio electrónico de transmisión a 60 KV (JEOL 1200 EX II).

Como control, se hizo el mismo procedimiento pero sin la incubación con los anticuerpos.³⁸

Se tomaron fotos representativas de cada estado de diferenciación de *N. crassa*, tanto de los controles como de los experimentales, mostrando una parte de la pared celular, el núcleo, las mitocondrias, el citoplasma y el fondo.

19. Cuantificación de la catalasa-1 y de la catalasa-2

Una vez hecha la inmunodetección de la Cat-1 y de la Cat-2, se analizaron los cortes de los diferentes estados de diferenciación de *N. crassa* y se hizo la cuantificación de las partículas de oro en la pared celular, las mitocondrias, el núcleo, el citoplasma.

Para hacer la cuantificación, se analizó un total de 3 μm^2 de cada una de las estructuras, restándole la cantidad de partículas de oro encontradas en el fondo del corte, tomando este total como 100%. El resultado se expresó en número de partículas de oro / μm^2 y en porcentaje.

VII) Resultados

1. Purificación de la catalasa-1

Los principales pasos de purificación de la Cat-1 fueron la congelación y descongelación, la precipitación con acetona, precipitación con sulfato de amonio al 35%. Se logró eluir la Cat-1 pura en las fracciones recuperadas con la mezcla de Na_2HPO_4 y K_2HPO_4 10 mM. Las fracciones con mayor actividad se concentraron por medio de un filtro Amicon, obteniendo un aumento en la actividad específica de 170 veces y un rendimiento del 48%. Al ser analizada la enzima en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes se observa una pureza mayor del 90% (Díaz, comunicación personal).

2. Producción de anticuerpos anti-Cat-1

Se logró obtener un suero hiperinmune con un alto título de anticuerpos contra la Cat-1 después de 3 inoculaciones al conejo con la proteína nativa. Para hacer la titulación de los anticuerpos mediante la técnica de "Western Blot", se manejaron diferentes diluciones del suero.

Con un extracto de micelio, crecido durante 20 horas y separado por electroforesis en un gel en condiciones desnaturalizantes, los anticuerpos dieron un título de 1:5,120 (Fig. 3a).

Con un extracto de conidios, separado por electroforesis en un gel en condiciones no desnaturalizantes, los anticuerpos dieron un título de 1: 2,621,440 (Fig. 3c).

Con un extracto de micelio que fue sometido a tensión calórica, separado por electroforesis en un gel en condiciones no desnaturalizantes, los anticuerpos tuvieron un título de 1:1,280 (Fig. 3d).

Los anticuerpos en estos extractos reconocen a la Cat-1a.

Con un extracto de micelio crecido durante 20 horas, separado por electroforesis de un gel en condiciones no desnaturalizantes, los anticuerpos tuvieron un título de 1:640 (Fig. 3b). Los anticuerpos reconocen a la Cat-1a y a la Cat-1c.

Estos resultados indican que los anticuerpos reconocen tanto al monómero como al tetrámero de la Cat-1 y no detectan otras proteínas.

3. Glicosilación de la catalasa-1

Los resultados del "Western Blot" en la fig. 4 muestran que los anticuerpos producidos con la Cat-1 no tratada con peryodato de sodio, no reconocen ninguna banda de proteína en la membrana de nitrocelulosa con un extracto de micelio crecido durante 20 horas tratada con peryodato, a diferencia de la membrana control, que se incubó sin peryodato de sodio, en donde sí se ve que los anticuerpos reconocen a la Cat-1. Esto sugiere que los anticuerpos obtenidos están dirigidos contra los residuos de carbohidratos de la Cat-1.

4. Caracterización de los anticuerpos anti-catalasa-1

Se hizo la caracterización de los anticuerpos anti Cat-1 producidos con la Cat-1 tratada con peryodato de sodio. Los extractos de micelio de *Aspergillus nidulans*, de conidios de *Neurospora crassa*, de hígado de rata y de la catalasa bovina, separados por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y en un gel en condiciones no desnaturizantes, se transfirieron a las membranas de nitrocelulosa y se les dió un tratamiento con peryodato de sodio. El control se hizo sin peryodato de sodio. Para el "Western Blot" se usaron los anticuerpos con una dilución de 1:1,000. No se observó ninguna diferencia entre las membranas tratadas con peryodato y las membranas control, por lo que estos resultados indican que los anticuerpos están dirigidos contra la parte proteica y no contra los carbohidratos. Los anticuerpos no reconocen la Cat-A (resultado no mostrado) ni la Cat-B de *A. nidulans*, de rata y bovina por lo que son específicos para la Cat-1 de *N. crassa* (Fig 5).

5. Inmunolocalización cuantitativa de la catalasa-1

Utilizando los anticuerpos anti-Cat-1 de *N. crassa*, se determinó la localización intracelular mediante la técnica de proteína A oro en los diferentes estados de diferenciación de *N. crassa*.

Micelio vegetativo: Como podemos observar en la fig. 6, los resultados muestran que la mayor parte de la Cat-1 está localizada en la pared celular (56.8%), aunque también se localiza en el citoplasma (22%), las mitocondrias (13.1%) y los núcleos (8%) (Gráfica 1, Tabla 1).

Micelio adherido: Los resultados muestran que la mayor parte de la Cat-1 se localiza en la pared celular (86.9%) y también se localiza en los núcleos (13.1%), pero no se observó Cat-1 en las mitocondrias ni en el citoplasma (Fig. 7, Gráfica 1, Tabla 1).

Micelio aéreo: La fig. 8 nos muestra que la Cat-1 se localiza principalmente en la pared celular (38.9%) y también se encuentra en los núcleos (26.7%), las mitocondrias (20%) y en el citoplasma (14.4%) (Gráfica 1, Tabla 1).

Conidios: Los resultados nos muestran que la mayor parte de la Cat-1 se localiza en la pared celular (66.5%) y en menor porcentaje la encontramos en el citoplasma (17%), las mitocondrias (8.7%) y los núcleo (7.8%) (Fig. 9, Gráfica 1, Tabla 1).

6. Purificación de la catalasa-2

La Cat-2 se obtuvo a partir de la fracción de la Cat-1 eluída con 10 mM Na_2HPO_4 y K_2HPO_4 . La fig. 10 nos muestra esta fracción que contiene la Cat-2. Se corrió una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes, cargados por proteína. La banda de actividad de la Cat-2 se sometió a electroelución. A la Cat-2 pura, se le dió el tratamiento con peryodato de sodio para la generación de anticuerpos.

7. Producción de anticuerpos anti-Cat-2

Después de dar 6 inyecciones al conejo con la proteína nativa, se obtuvo un suero hiperinmune con un título de anticuerpos alto. Para hacer la titulación de los anticuerpos anti-Cat-2 mediante la técnica de "Western Blot", se manejaron diferentes diluciones del suero.

La titulación de los anticuerpos con un extracto de micelio crecido durante 20 h, sometido a tensión calórica y separado por electroforesis en un gel en condiciones desnaturalizantes, fue de 1:16,000 (Fig. 11a).

La titulación de los anticuerpos con un extracto de micelio, crecido durante 20 h, sometido a tensión calórica y separado por electroforesis en un gel de condiciones no desnaturalizantes, fue de 1:800 (Fig. 11b).

Estos resultados indican que los anticuerpos reconocen tanto a la proteína nativa como a la desnaturalizada y no reconocen otras proteínas.

8. Glicosilación de la catalasa-2

Los resultados del "Western Blot" en la fig. 12 muestran que los anticuerpos producidos con la catalasa-2 no tratada con peryodato de sodio, están dirigidos contra la parte proteica. En la membrana de nitrocelulosa tratada con peryodato de sodio y en la membrana control, con un extracto de micelio crecido durante 20 horas y sometido a tensión calórica, se mantiene el reconocimiento de la Cat-2 con los anticuerpos específicos. Esto nos dice que, posiblemente, la Cat-2 no tenga residuos de carbohidratos.

9. Caracterización de los anticuerpos anti-catalasa-2

Se hizo la caracterización de los anticuerpos anti-Cat-2 utilizando los extractos de micelio de *Aspergillus nidulans*, de conidios de *N. crassa*, de hígado de rata y con la catalasa bovina, separados por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes, éstos extractos se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se les dió un tratamiento con peryodato de sodio. El control se hizo sin peryodato de sodio. Para el "Western Blot" con las membranas transferidas de un gel en condiciones desnaturalizantes se utilizaron los anticuerpos a una dilución 1:4,000. Para el "Western Blot" con las membranas transferidas de un gel en condiciones no desnaturalizantes se utilizaron los anticuerpos con una dilución 1:400.

No se observó ninguna diferencia entre las membranas tratadas con peryodato y las membranas control, por lo que estos resultados sugieren que los

anticuerpos están dirigidos contra la parte proteica y no contra los carbohidratos que puedan estar unidos a la proteína. Los anticuerpos no reconocen la Cat-B de *A. nidulans*, ni la catalasa de rata y bovina. (Fig. 13).

10. Inmunolocalización cuantitativa de la catalasa-2

Utilizando los anticuerpos anti-Cat-2 de *N. crassa*, se determinó la localización intracelular mediante la técnica de inmunomarcaje con proteína A oro en los estados de crecimiento y durante la diferenciación de *N. crassa*.

Micelio vegetativo: Como se puede ver en la fig. 14, la mayor parte de la Cat-2 se localiza en la pared celular (47.8%), también se localiza en las mitocondrias (25.7%), el citoplasma (15.3%) y los núcleos (11.2%) (Gráfica 2, Tabla 2).

Micelio adherido: La fig. 15 muestra que la Cat-2 se localiza principalmente en la pared celular (59.2%), las mitocondrias (28.6%) y en menor proporción en el citoplasma (10.2%) y en los núcleos (2%) (Gráfica 2, Tabla 2).

Micelio aéreo: Los resultados muestran que la Cat-2 se localiza en las mitocondrias (35.5%), además de la pared celular (24.5%), el citoplasma (23.2%) y en los núcleos (16.8%), (fig. 16, Gráfica 2, Tabla 2).

Conidios: En esta etapa de diferenciación de *N. crassa*, los resultados muestran (fig. 17) que la Cat-2 se localiza prácticamente en la misma proporción tanto en la pared celular (41.8%), como en las mitocondrias (39.3%) y se localiza en menor proporción en los núcleos (11.5%) y en el citoplasma (7.4%) (Gráfica 2, Tabla 2).

VIII) Discusión

En este trabajo, se ha presentado la caracterización parcial de dos catalasas de *N. crassa*, una catalasa típica (Cat-1) y una catalasa-peroxidasa (Cat-2), partiendo de la proteína pura y utilizando anticuerpos específicos. Con la obtención de los anticuerpos es posible conocer la localización de estas enzimas durante el ciclo de vida de *N. crassa*.

Mediante la técnica de inmunomarcaje con proteína A oro encontramos que la mayor parte de la Cat-1 de *N. crassa* se encuentra localizada en la pared celular durante el crecimiento y los estados de diferenciación. También se encuentra en menor porcentaje en otras estructuras intracelulares (Gráfica 1, Tabla 1).

La Cat-2 se encuentra localizada mayoritariamente en la pared celular, en el micelio adherido y el micelio vegetativo. En el micelio aéreo la Cat-2 se encuentra en mayor porcentaje en las mitocondrias, y en los conidios está prácticamente en la misma proporción tanto en la pared celular como en las mitocondrias (Gráfica 2, Tabla 2).

Los anticuerpos específicos producidos contra la Cat-1 y contra la Cat-2 de *N. crassa* están dirigidos contra la parte proteica, no contra los carbohidratos, reconocen la forma nativa y desnaturalizada de la proteína y no reconocen las proteínas contaminantes. Con esto podemos decir que estamos localizando tanto las formas activas como inactivas de la Cat-1 y la Cat-2 de *N. crassa*.

1. Glicosilación de la catalasa

La Cat-1 de *N. crassa* tiene residuos de carbohidratos unidos a la proteína. Se observó diferencias en el reconocimiento de esta proteína por los anticuerpos específicos contra Cat-1 cuando se trató la proteína con peryodato para remover los carbohidratos (Fig. 4). Por otra parte, el peso molecular de la Cat-1 de *N. crassa* de acuerdo con su secuencia de aminoácidos es de 79,139 Daltones para el monómero (datos del laboratorio), mientras que el peso molecular obtenido por electroforesis de la proteína entrecruzada es de 88.6 kDa (Fig.2). La diferencia en parte se puede deber a la presencia de carbohidratos en la Cat-1.

Entre varias lectinas únicamente la Concanavalina A se une a la Cat-1, lo que sugiere que la Cat-1 contiene residuos de glucosa y / o manosa. Adicionalmente, se tiñó la enzima separada por electroforesis en un gel de poliacrilamida usando la reacción de PAS (Peryodic Acid Schiff). Los resultados indican que la Cat-1 contiene carbohidatos.

La Cat-2 de *N. crassa* parece no tener unidos residuos de carbohidatos, ya que no se observan cambios en el reconocimiento de esta catalasa con los anticuerpos después de un tratamiento con peryodato para eliminar los carbohidatos (Fig. 12). Los resultados sugieren que los anticuerpos sólo reconocen la proteína. Como cabe la posibilidad de que el peryodato no haya eliminado los carbohidatos por completo, se hizo el ensayo con lectinas para detectar la presencia de glicósidos unidos a la proteína. Los resultados mostraron que no hay ningún azúcar que se una con las lectinas utilizadas. También se hizo la reacción de PAS y no se obtuvo tinción de la proteína. Estos resultados sugieren que la Cat-2 no contiene carbohidatos.

En la literatura existen datos que mencionan la presencia de carbohidatos en algunas catalasas de hongos. Witteveen sugiere que la localización extracelular de la catalasa de *Aspergillus niger* es debida a que está glicosilada.⁴⁰ Fowler sugiere que la proteína puede ser transportada al retículo endoplásmico y al aparato de Golgi, en donde son agregados los residuos de moléculas de carbohidatos.²⁴ También la catalasa-1 de *Aspergillus fumigatus* es una glicoproteína y posee dos tipos de cadenas N-glicosídicas.⁴¹ En *Claviceps purpurea* la catalasa (CPCAT1) contiene tres sitios de N-glicosilación, “lo cuál indica que CPCAT1 es una catalasa secretada”.⁴² Zhao muestra que los carbohidatos, como las ciclodextrinas incrementan la estabilidad *in vitro* de la superóxido dismutasa en condiciones de altas temperaturas y valores de pH extremos.⁴³ El que la Cat-1 posea carbohidatos en su estructura, puede conferirle una mayor estabilidad. De hecho, los datos del laboratorio muestran que la Cat-1 de *N. crassa* es una enzima muy estable.

2. Localización celular de las catalasas

En varios organismos se ha determinado la localización de una catalasa utilizando distintas técnicas, como el fraccionamiento por centrifugación, la tinción con diaminobencidina en los cortes para microscopía de transmisión y el inmunomarcaje con proteína A oro en microscopía de transmisión. En la literatura hay pocos trabajos sobre la localización de la catalasa con este último método. El inmunomarcaje resulta ser una técnica más confiable ya que los anticuerpos producidos son específicos. En cambio, la detección de la catalasa en las mitocondrias utilizando el método de la diaminobencidina no es muy confiable ya que la tinción puede ser atribuible al citocromo c.⁴⁴

En este trabajo, el método usado para la fijación de las estructuras intracelulares, la infiltración y polimerización con la resina LR White permiten una mayor antigenicidad en comparación con otras técnicas como lo es la infiltración y polimerización con Epon. En base a esto y a la especificidad de los anticuerpos utilizados, nuestros resultados son confiables.

Aunque en *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Claviceps purpurea* y *Neurospora crassa* las catalasas estudiadas se encontraron sobre todo en la pared celular, no todas las catalasas de los microorganismos son exocelulares.

Hillar⁴⁵ muestra la localización intracelular de la catalasa HPI de *E. coli* mediante la técnica de inmunomarcaje con proteína A oro, encontrando las partículas de oro en toda la sección del corte. Mediante la técnica de fraccionamiento celular por centrifugación, encuentra que la mayor parte de la actividad de la catalasa (>95%) se encuentra en el citoplasma y en la fracción de la membrana interna. El resto de la actividad de catalasa se encontró en la fracción periplásmica.

Transfiriendo el gen de una catalasa-peroxidasa de *Synechococcus* PCC 7942 (CPX) a células de la línea 104C1 de cobayo, se observó un incremento de la actividad específica de catalasa de 2 - 6.6 veces. Mediante la centrifugación diferencial e "inmunoblot" se localizó la CPX en el citosol.¹⁴

En el maíz, midiendo la actividad de catalasa, se encontró que la Cat-2 (catalasa típica) se localiza en los peroxisomas del haz de la hoja,¹⁵ la Cat-3 (catalasa-peroxidasa) mostró actividad en las mitocondrias de las células mesófilas.⁴⁶

En *Saccharomyces cerevisiae* se encontró mediante técnicas citoquímicas una actividad de catalasa en los peroxisomas y una actividad de peroxidasa en las mitocondrias.⁴⁷ La catalasa atípica (catalasa-A) se localiza en los peroxisomas, donde ocurre la oxidación de los ácidos grasos. La catalasa típica (catalasa-T) se localiza en el citoplasma, la cuál es sintetizada en respuesta a una tensión de tipo metabólico o ambiental.²⁴

Por otra parte, sobreexpresando la catalasa de *Candida tropicalis* (CTC) en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* sin catalasas ($\Delta A\Delta T$), Kinoshita⁴⁸ muestra la localización peroxisomal de una parte de esta catalasa. Para ello, utilizó anticuerpos anti CTC mediante la técnica de proteína A oro. El trabajo muestra que sólo la forma tetramérica activa de la catalasa está presente dentro de los peroxisomas y que las diferentes formas multiméricas, incluyendo la forma tetramérica activa, son producidas fuera de los peroxisomas. Sugiere que las subunidades de la catalasa y el hemo son transportados del citosol a través de la membrana peroxisomal donde los peroxisomas no permiten el paso de las subunidades o formas multiméricas, pero sí de la forma tetramérica.⁴⁸

Mediante la técnica citoquímica de la 3,3'-diaminobencidina en *Aspergillus niger* se demostró la actividad de una catalasa en los peroxisomas y en la pared celular, así como en la capa externa de la misma.⁴⁰ Utilizando técnicas electroforéticas por medio de geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes, se encontraron 4 catalasas distintas en *A. niger*, de las cuáles dos son constitutivas (Cat I, Cat II) y las otras dos se inducen (Cat III, Cat IV) cuando la actividad de la glucosa oxidasa se incrementa. La Cat I y la Cat III se localizan dentro de la célula, mientras que las Cat II y Cat IV se localizan principalmente en la pared celular.⁴⁰

En *A. nidulans*, se mostró la presencia de la CatA en los conidios²⁵ y de la CatB en un micelio de 48 horas de crecimiento,¹⁶ utilizando anticuerpos y la

técnica de proteína A oro. La mayor parte de la CatA y de la CatB se localizan en la pared celular. Sin embargo, ambas catalasas se extraen parcialmente en los extractos de proteína soluble.^{16, 25}

Utilizando técnicas de biología molecular, Navarro y Aguirre proponen que la localización específica de la Catalasa A de *Aspergillus nidulans* está mediada por la 5' UTR del ARNm de *catA* y esto ocurre en dos pasos. El mensaje de *catA* puede estar acumulado en una forma inactiva para la traducción, en respuesta a diferentes condiciones de tensión, incluyendo exposición al aire. Esto puede ser el resultado de un incremento en la transcripción de *catA* y/o la estabilización del mensaje. En un segundo paso, el ARNm de *catA* acumulado puede ser trasladado a mótulas, fiálides, conidiosporas y ascosporas⁴⁹.

En *Claviceps purpurea*, utilizando anticuerpos policlonales con la técnica de proteína A oro, Garre localizó la catalasa en la pared celular y en el citoplasma, aunque en este último con menos marcaje. En el núcleo, las mitocondrias, los cuerpos lipídicos y grandes vacuolas, no se presentó especificidad de los anticuerpos.²⁶ Los autores sugieren que no hay peroxisomas cuando los hongos son crecidos en un medio con glucosa.²⁶

En base a estos resultados y los resultados obtenidos en la inmunolocalización en *N. crassa* en este trabajo, podemos mencionar que la Cat-1 tiene una función de protección contra el peróxido de hidrógeno exógeno así como el producido metabólicamente en la pared celular, como el generado por la glucosa oxidasa. Además, protege contra el H₂O₂ producido por el metabolismo durante todos los estados diferenciados. Esta Cat-1 en *N. crassa* es la que presenta mayor actividad y se acumula en grandes cantidades en los conidios. La acumulación de esta catalasa en los conidios puede estar relacionado con la germinación sobre un sustrato vegetal que genera una alta concentración de H₂O₂.

La presencia de la Cat-2, una catalasa-peroxidasa, tiene una función de protección contra el H₂O₂ exógeno y contra el H₂O₂ metabólico. La actividad se induce en el micelio aéreo, en los conidios y sobre todo en condiciones de tensión calórica.

El hecho que una gran parte de la Cat-1 y la Cat-2 estén asociadas con la pared celular no quiere decir que no puedan solubilizarse en un extracto celular. Esto es debido a que la mayor parte de estas catalasas se localizan cerca de la pared celular, tanto del lado interno como externo y sólo una parte minoritaria se encuentra dentro de la pared celular. De hecho, sólo un 10 - 20 % de estas catalasas no se puede solubilizar en un extracto celular y queda atrapado en la fracción insoluble.

IX) Bibliografía

- 1) Hansberg, W., Aguirre, J.: La diferenciación celular en microorganismos. *Ciencia*. 1990; **41**, 21-28.
- 2) Hansberg, W.: A hyperoxidant state at the start of each developmental stage during *Neurospora crassa* conidiation. *Ciencia e Cultura*. 1996; **48**, 68-74.
- 3) Hansberg, W., Aguirre, J.: Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J. theor. Biol.* 1990; **142**, 201-221.
- 4) Griffin, D. H.: Fungal Physiology. 2ª ed. Ed. *Wiley-Liss*. USA. 1994.
- 5) Carlile, M. J., Watkinson, S.C.: The Fungi. *Academic Press*. Great Britain. 1994.
- 6) Toledo, I., Aguirre, J., Hansberg, W.: Enzyme inactivation related to a hiperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*. *Microbiology*. 1994; **140**, 2391-2397.
- 7) Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 1984; **219**, 1-14.
- 8) Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.: Free Radicals in Biology and Medicine. 2ª ed. *Clarendon Press*. Great Britain. 1989.
- 9) Yu, B.P.: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 1994; **74**, 139-162.
- 10) Davies, K.J., Sevanian, A., Muakkassah-Kelly, S.F., Hochstein, P.: Uric acid-iron complex: a new aspect of the antioxidant function of uric acid. *Biochem. J.* 1986; **235**, 747-754.
- 11) Hauptmann, N., Cadenas, E.: The oxygen paradox: Biochemistry of active oxygen. En *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. New York. 1997; 1-20.
- 12) Jacob, G.S., Orme-Johnson, W.H.: Catalase of *Neurospora crassa*. 2. Electron paramagnetic resonance and chemical properties of the prosthetic group. *Biochemistry*. 1979; **18**, 2975-2980.

- 13) Goldberg, I., Hochman, A.: Three different types of catalases in *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1989; **268**, 124-128.
- 14) Ishikawa, T., Ohta, Y., Takeda, T., Shigeoka, S., Nishikimi, M.: Increased cellular resistance to oxidative stress by expression of cyanobacterium catalase-peroxidase in animal cells. *FEBS Letters.* 1998; **426**, 221-224.
- 15) Havir, A.E., McHale, N.A.: Enhanced peroxidatic activity in specific catalase isozymes of tobacco, barley and maize. *Plant Physiol.* 1989; **91**, 812.
- 16) Kawasaki, W. L.: Las catalasas y la respuesta antioxidante durante el crecimiento y la diferenciación en *Aspergillus nidulans*. 1998. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM.
- 17) Jacob, G.S., Orme-Johnson, W.H.: Catalase of *Neurospora crassa*. 1. induction, purification and physical properties. *Biochemistry.* 1979; **18**, 2967-2974.
- 18) Hermann, R., Rudolph, R., Jaenicke, R.: Kinetics of *in vitro* reconstitution of oligomeric enzymes by cross-linking. *Nature.* 1979; **277**, 243-246.
- 19) Chang, G., Huang, T., Chang, T.: Reversible dissociation of the catalytically active subunits of pigeon liver malic enzyme. *Biochem. J.* 1988; **254**, 123-130.
- 20) Huang, T., Chang, G.: Characterization of the tetramer-dimer-monomer equilibrium of the enzymatically active subunits of pigeon liver malic enzyme. *Biochemistry.* 1992; **31**, 12658-12664.
- 21) Lledías, F., Rangel, P., Hansberg, W.: Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**, 10630-10637.
- 22) Chary, P., Natvig, D.: Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa* : effects of oxidative stress, heat shock, and development. *J. Bacteriol.* 1989; **171**, 2646-2652.
- 23) Middelkoop, E., Wiemer, E., Schoenmaker, D.T., Strijland, A., Tager, J.M.: Topology of catalase assembly in human skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Acta.* 1993; **1220**, 15-20.
- 24) Fowler, T., Rey, M.W., Vähä-Vahe, P., Power, S., Berka, R.: The catR gene encoding a catalase from *Aspergillus niger*. Primary structure and elevated expression through increased gene copy number and use of a strong promoter. *Mol Microbiol.* 1993; **9**, 989-998.

- 25)** Navarro, G.R.E.: Regulación del gen *catA* durante la esporulación de *Aspergillus nidulans*. 1998. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM.
- 26)** Garre, V., Tenberge, K.B., Eising, R.: Secretion of a fungal extracellular catalase by *Claviceps purpurea* during infection of rye: putative role in pathogenicity and suppression of host defense. *Phytopathology*. 1998; **88**, 744-753.
- 27)** Vogel, H.J.: Distribution of lysine pathways among fungi: Evolutionary implications. *Amer. Nat.* 1964; **98**, 435-446.
- 28)** Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*. 1970; **227**, 680.
- 29)** del Río, L.A., Gómez Ortega, M., Leal López, A., López Gorgé, J.: A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode. *Anal. Biochem.* 1977; **80**, 409-415.
- 30)** Takeda, A., Cone, R.E.: Two-dimensional peptide by polyacrilamide-gel electrophoresis with limited proteolysis in SDS. *Biochem. Biophys Res Comm.* 1984; **122**, 932-937.
- 31)** Wasserman, B., Hultin, H.: Effect of deglycosilation on the stability of *Aspergillus niger* catalase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1981; **212**, 385-392.
- 32)** Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Strober, W.: Current protocols in immunology. Analysis of proteins. Ed. *Wiley Interscience*. Vol.1. USA. 1991.
- 33)** Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some aplicaciones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979; **76**, 4350-4354.
- 34)** Gibson, W.: Protease-facilitated transfer of high-molecular-weight proteins during electrotransfer to nitrocellulose. *Anal. Biochem.* 1981; **118**, 1-3.
- 35)** Bradford, M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; **72**, 248-254.

- 36) Gershoni, J., Palade, G.: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gels to a positively charged membrane filter. *Anal. Biochem.* 1982; **124**, 396-405.
- 37) Hayat, M.A.: Basic Techniques for Transmission Electron Microscopy. *Academic Press*. San Diego, Cal. 1986, 321.
- 38) Bullock, G.R., Petrusz, P.: Techniques in Immunocytochemistry. *Academic Press*. Vol. 1. London. 1982, 112-125.
- 39) Reynolds, E.S.: The use of lead citrate at high pH an electron opaque stain for electron microscopy. *J. Cell Biol.* 1963; **17**, 208-211.
- 40) Witteveen, C., Veenhuis, M., Visser, J.: Localization of glucose oxidase and catalasa activities in *Aspergillus niger*. *Appl Env Microbiol.* 1992; **58**, 1190-1194.
- 41) López-Medrano, R., Ovejero, M.C., Calera, J.A., Puente, P., Leal, F.: An immunodominant 90-Kilodalton *Aspergills fumigatus* antigen is the subunit of a catalase. *Infect. Immun.* 1995; **63**, 4774-4780.
- 42) Garre, V., Müller, U. and Tudzynski, P.: Cloning, Characterization, and targeted disruption of *cpcat1*, coding for an in planta secreted catalase of *Claviceps purpurea*. *MPMI.* 1998; **11**, 772-783.
- 43) Zhao, X.B., Qian, H., Courtney, J.M.: Artificial cell containing superoxide dismutase. Selection of folding aids for stabilisation of SOD. *Artificial cells bloods Substitutes and Immobilization Biotechnology.* 1998; **26**, 341-358.
- 44) Fukui, S., Kawamoto, S., Yasuhara, S., Tanaka, A., Osumi, M., Imaizumi, F.: Microbody of methanol-grown yeast. Localization of catalase and flavin-dependent alcohol oxidase in the isolated microbody. *Eur. J. Biochem.* 1975; **59**, 561-566.
- 45) Hillar, A., Van C.L., Lowen, P.C.: Intracellular location of catalase-peroxidase hydroperoxidase I of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999; **170**, 307-312.
- 46) Scandalio, J.G., Tong W.F., Rouparias D.G.: Cat 3, 3rd gene locus coding for a tissue specific catalase in maize (*Zea mays*): genetics, intracellular location and some biochemical properties. *Mol. Gen. Genet.* 1980; **179**, 33-42.
- 47) Hoffmann, H.P., Szabo, A., Avers, C.J.: Cytochemical localization of catalase activity in yeast peroxisomes. *J. Bacteriol.* 1970; **104**, 581-584.

- 48)** Kinoshita, H., Ueda, M., Atomi, H., Hashimoto, N., Kobayashi, K., Yoshida, T., et al.: Expression and subcellular localization of *Candida tropicalis* catalase in catalase gene disruptants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* 1998; **85**, 571-578.
- 49)** Navarro, R.E., Aguirre, J.: Posttranscriptional control mediates cell type-specific localization of catalase A during *Aspergillus nidulans* development. *J. Bacteriol.* 1998; **180**(21), 5733-5738.

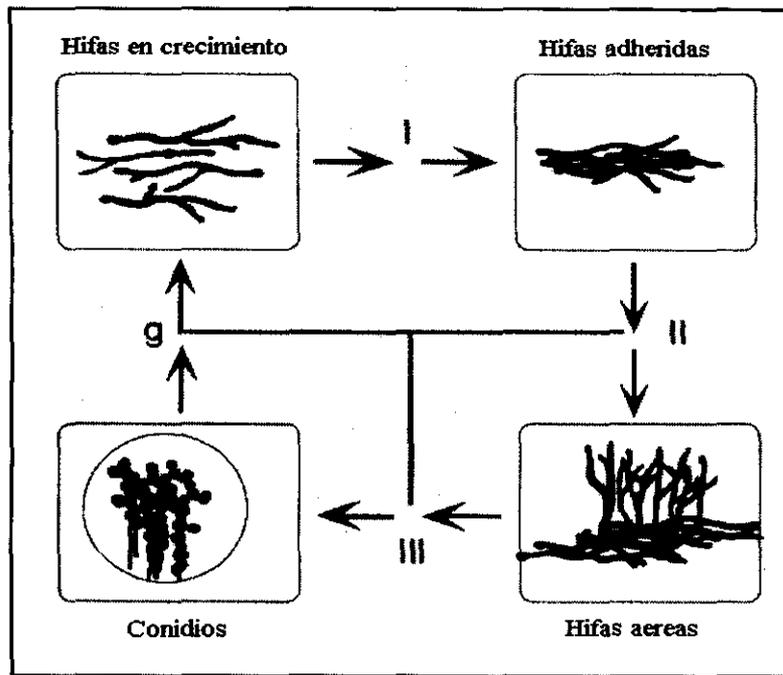


Fig. 1 Estados de diferenciación durante el ciclo de vida asexual de *N. crassa*. Durante el ciclo se presentan 3 transiciones. (Hansberg, 1996)

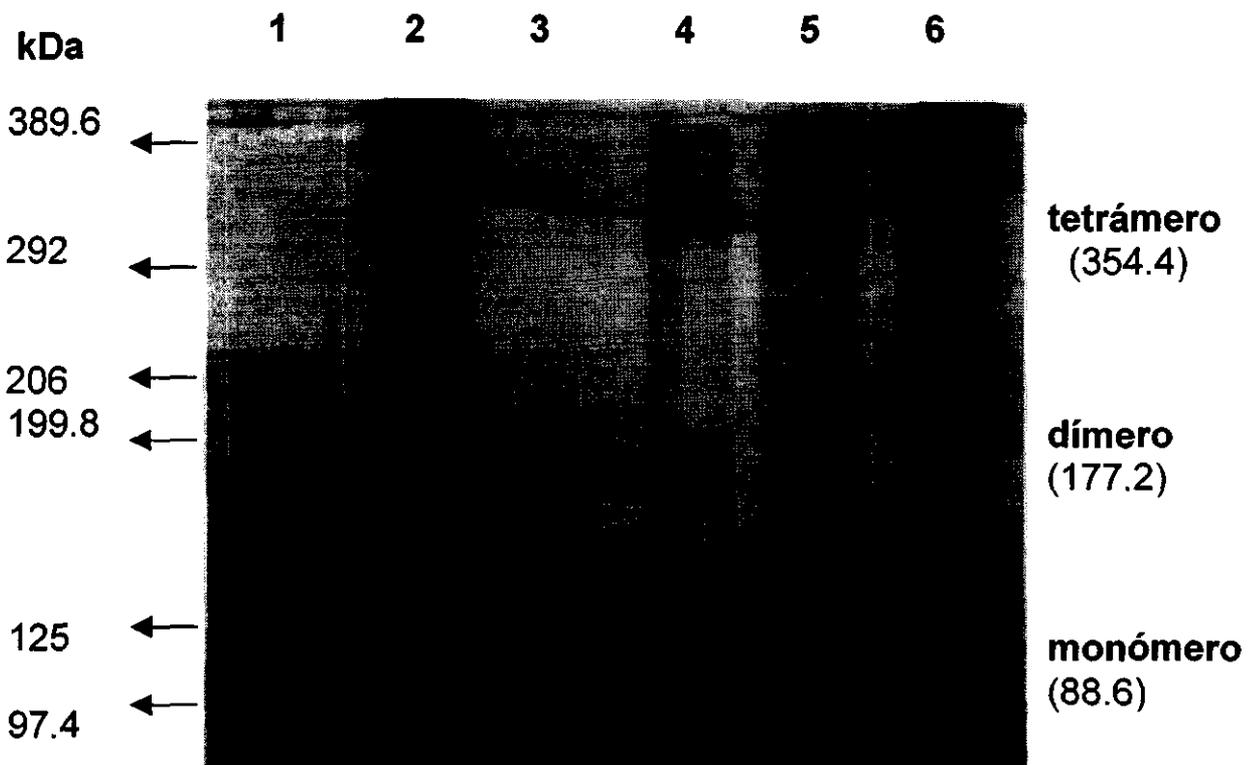


Fig. 2 Entrecruzamiento de la Cat-1 con glutaraldehido (promedio de 3 ensayos). Gel de poliacrilamida tipo Laemmli al 4.5%. En el gel se distinguen las diferentes subunidades que conforman a la Cat-1. (1) PM preteñidos. (2,6) PM entrecruzados. (3) Cat- 1 control. (4) Cat-1 con glutaraldehido 5mM. (5) Cat-1 con glutaraldehido 20 mM.

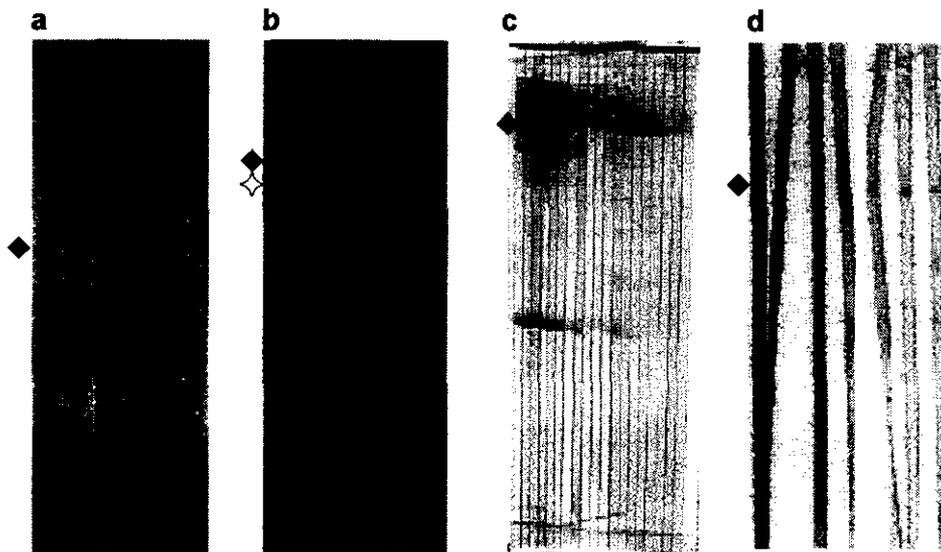


Fig. 3 Titulación del suero hiperinmune de los anticuerpos anti Cat-1 mediante "Western Blot". (a) Extracto del micelio crecido 20 h. separado en condiciones desnaturalizantes. Dil. 1:160-1:5,120, reconoce a la Cat-1a. (b) Extracto del micelio crecido 20 h. separado en condiciones no desnaturalizantes. Dil. 1:10-1:640, reconoce a la Cat-1a y a la Cat-1e. (c) Extracto de conidios separado en condiciones no desnaturalizantes. Dil. 1:10-1:2,621,440, reconoce a la Cat-1a. (d) Extracto del micelio crecido 20 h. sometido a tensión calórica separado en condiciones no desnaturalizantes. Dil. 1:20-1:1,280, reconoce a la Cat-1a. ◆Cat-1a. ◇Cat-1c.

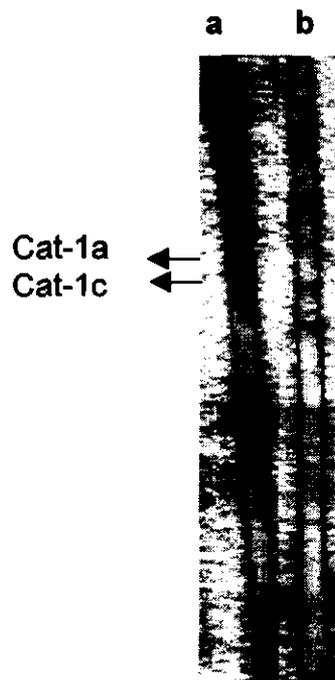


Fig. 4 Glicosilación de la Cat-1. Western Blot del micelio crecido 20 horas y separado por electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Panel a: Control. Panel b: Tratamiento con peryodato de sodio. Para este ensayo se utilizó el suero producido con la Cat-1 sin tratamiento con peryodato de sodio. El Western Blot se hizo a una dilución de 1:40.

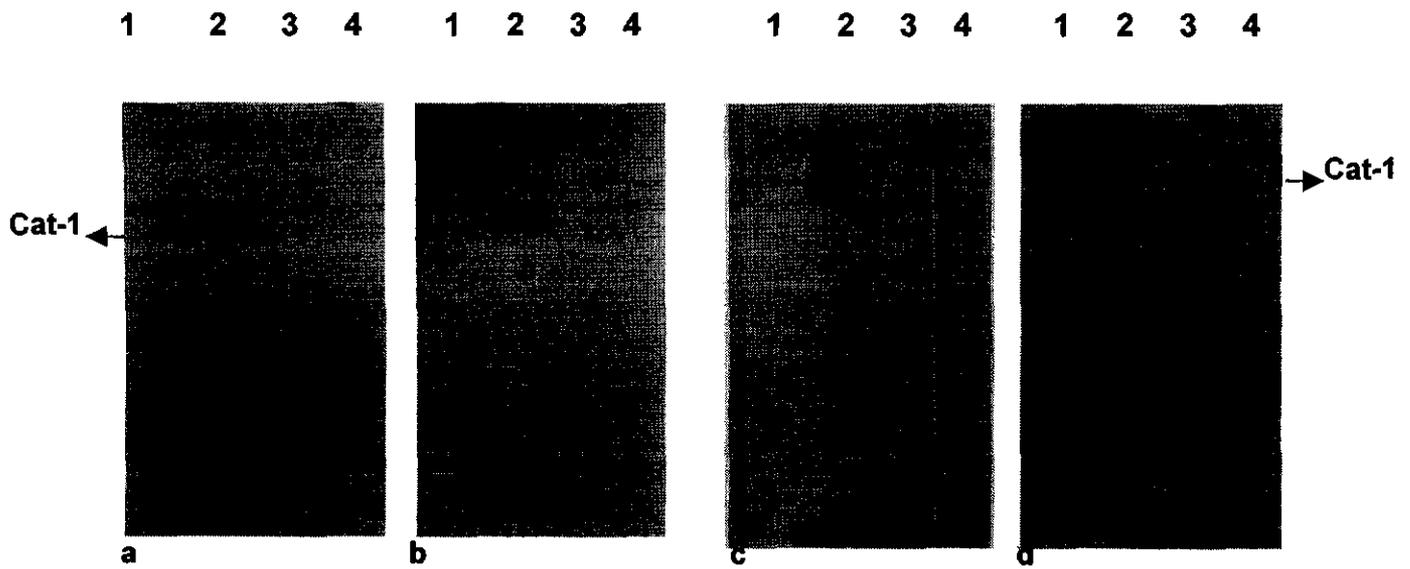


Fig. 5 Caracterización de los anticuerpos anti Cat-1 por "Western Blot". Carril 1: Extracto de micelio de *A. nidulans*. Carril 2: Extracto de conidios de *N. crassa*. Carril 3: Extracto de hígado de rata. Carril 4: Catalasa de hígado bovina. Panel a: Control del gel separado en condiciones desnaturalizantes. Panel b: Tratamiento con peryodato de sodio del gel tipo Laemmli. Panel c: Control del gel separado en condiciones no desnaturalizantes. Panel d: Tratamiento con peryodato de sodio del gel nativo. El Western Blot se hizo a una dilución de 1:1,000.



Fig. 6 Micrografía de transmisión. Detección de la Cat-1 en el micelio vegetativo. Amplificación 20,000. Barra = 200 nm.

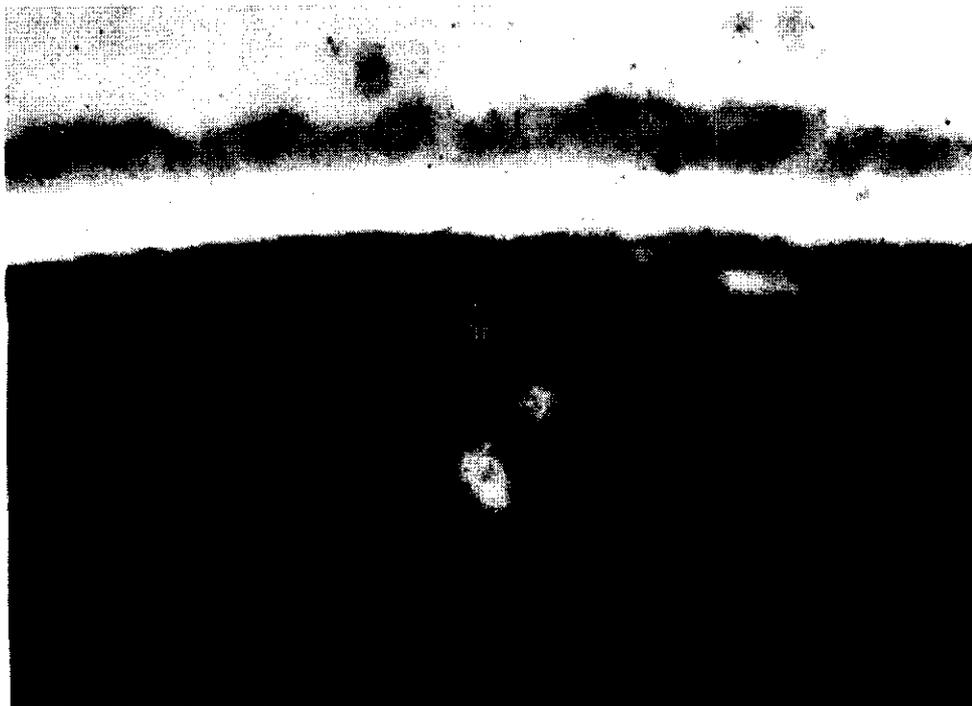


Fig. 7 Micrografía de transmisión. Detección de la Cat-1 en el micelio adherido. Amplificación 12,000. Barra = 500 nm.



Fig. 8 Micrografía de transmisión. Detección de la Cat-1 en el micelio aéreo. Amplificación 25,000. Barra= 200 nm.



Fig. 9 Micrografía de transmisión. Detección de la Cat-1 en los conidios. Amplificación 30,000. Barra= 200 nm.

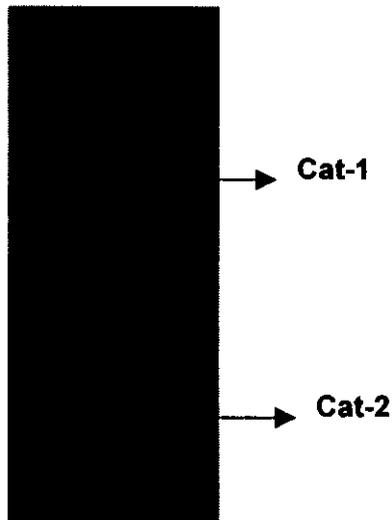


Fig. 10 Fracción de la Cat-1 eluída con 10 mM NaKHPO₄ que contiene a la Cat-2. Gel nativo cargado con 5 µg de proteína y teñido con azul de coomasie.

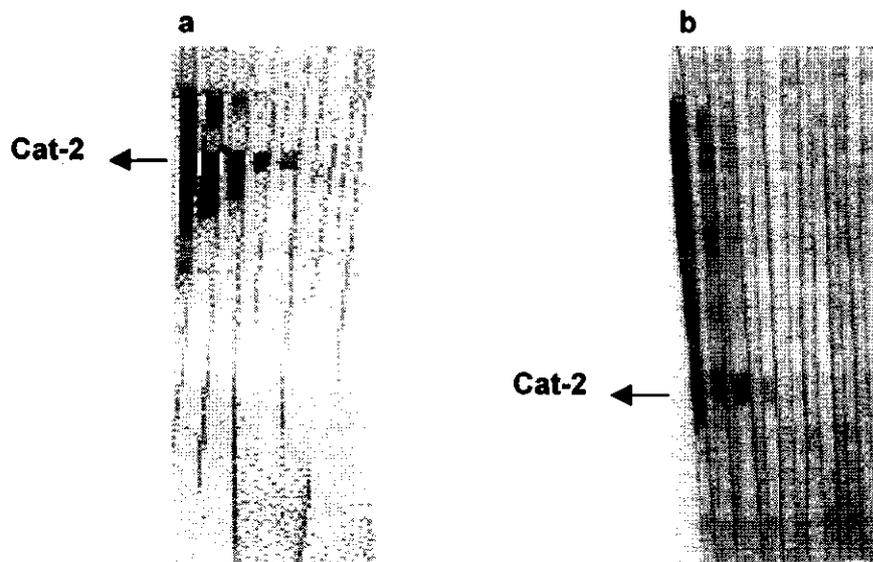


Fig. 11 Titulación del suero hiperinmune de los anticuerpos anti Cat-2 mediante "Western Blot". (a) Extracto del micelio crecido 20 h. sometido a tensión calórica de un gel separado en condiciones desnaturalizantes. Dil. 1:1,000-1:64,000. (b) Extracto del micelio crecido 20 h. sometido a tensión calórica de un gel separado en condiciones no desnaturalizantes. Dil. 1:100-1:12,800.

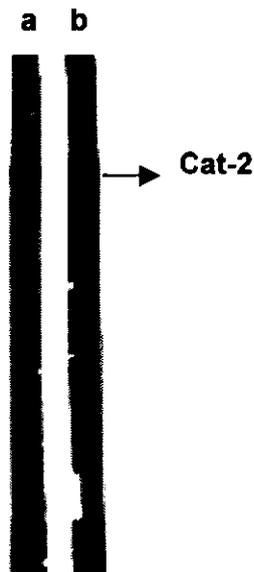


Fig. 12 Glicosilación de la Cat-2. Western Blot del extracto de micelio crecido 20 h. y sometido a tensión calórica separado por electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Panel a: Tratamiento con peryodato de sodio; Panel b: Control. El western Blot se hizo a una dilución de 1:500.

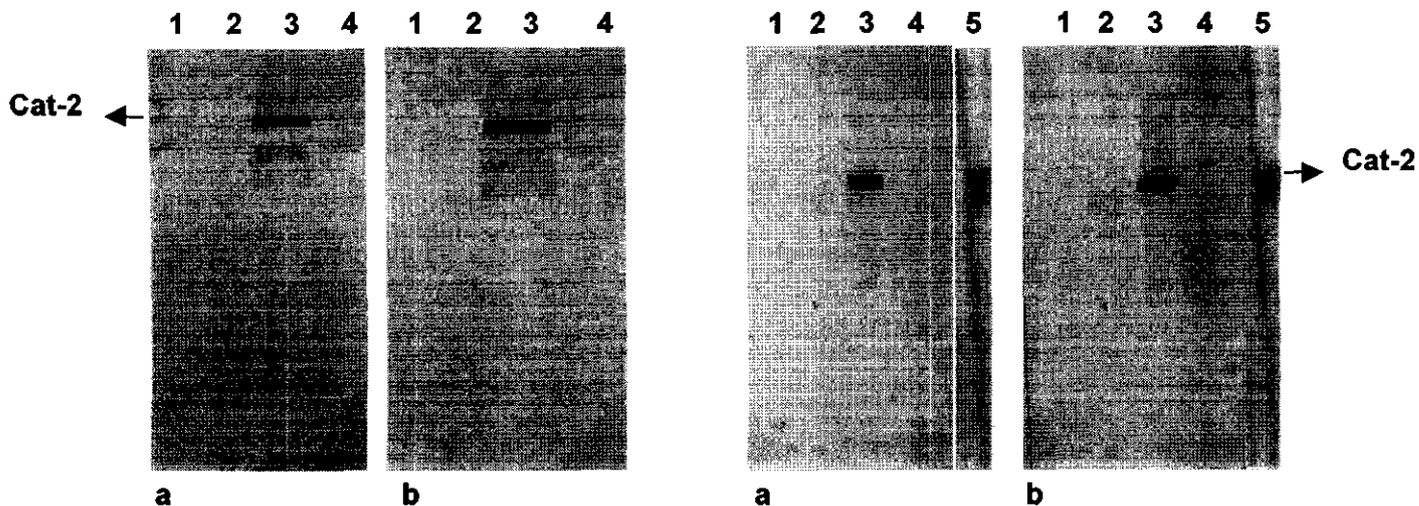


Fig. 13 Caracterización de los anticuerpos anti Cat-2 por "Western Blot". Carril 1: Catalasa de hígado bovina. Carril 2: Extracto de hígado de rata. Carril 3: Extracto de conidios de *N. crassa*. Carril 4: Extracto de micelio *A. nidulans*. Carril 5: Extracto de micelio de *N. crassa* crecido 20 h. sometido a tensión calórica. Panel a: Tratamiento con peryodato de sodio del gel separado en condiciones desnaturizantes. Panel b: Control del gel tipo Laemmli. Panel c: Tratamiento con peryodato de sodio del gel separado en condiciones no desnaturizantes. Panel d: Control del gel nativo. Panel a y b se manejó una dilución de 1:4,000. Panel c y d se manejó una dilución de 1:400.



Fig. 14 Micrografía de transmisión. Detección de la Cat-2 en el micelio vegetativo. Amplificación 25,000. Barra= 200 nm.



Fig. 15 Micrografía de transmisión. Detección de la Cat-2 en el micelio adherido. Amplificación 15,000. Barra= 500 nm.

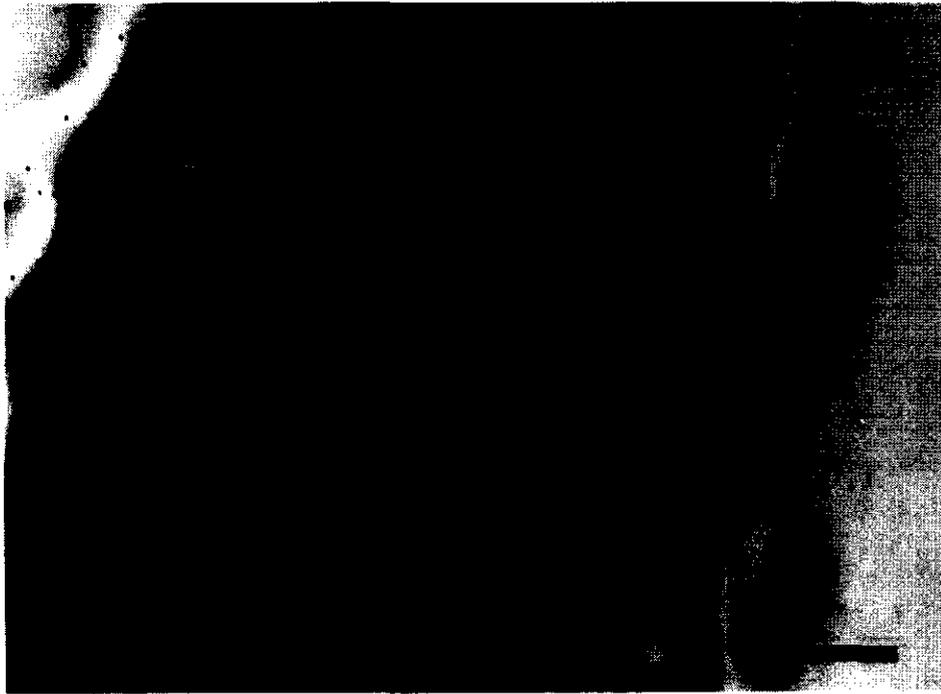


Fig. 16 Micrografía de transmisión. Detección de la Cat-2 en el micelio aéreo. Amplificación 20,000. Barra= 200 nm.



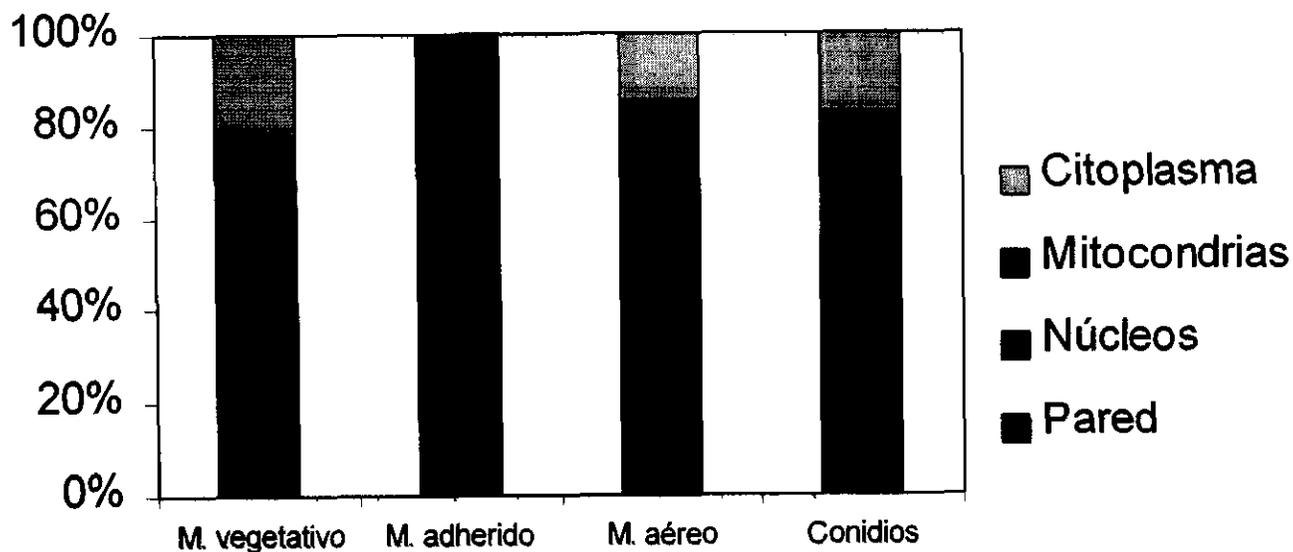
Fig. 17 Micrografía de transmisión. Detección de la Cat-2 en los conidios.
Amplificación 25,000. Barra= 200 nm.

Edo. crecimiento	Pared celular	Núcleos	Mitocondrias	Citoplasma
Micelio vegetativo	56.8% (121)	8% (17)	13.1% (28)	22% (47)
Micelio adherido	86.9% (53)	13.1% (8)	0	0
Micelio aéreo	38.9% (70)	26.7% (48)	20% (36)	14.4% (26)
Conidios	66.5% (145)	7.8% (17)	8.7% (19)	17% (37)

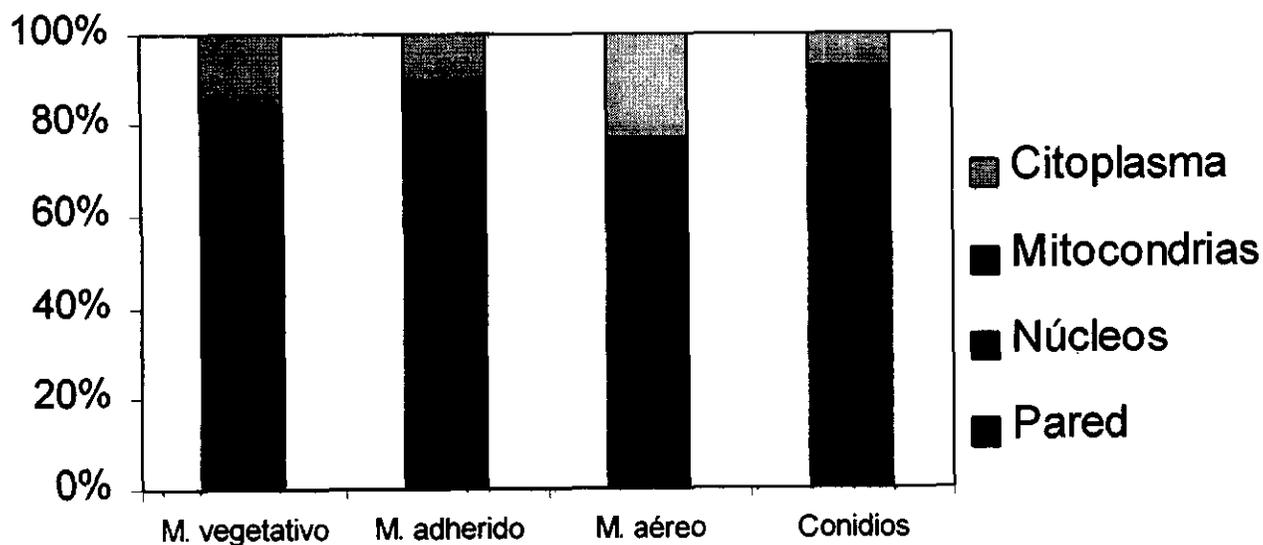
Tabla 1 Inmunolocalización y cuantificación de la Cat-1 durante el ciclo de crecimiento y diferenciación de *N. crassa*. La cuantificación se muestra en porcentaje (y en número de partículas de oro / μm^2).

Edo. Crecimiento	Pared celular	Núcleos	Mitocondrias	Citoplasma
Micelio vegetativo	47.8% (119)	11.2% (28)	25.7% (64)	15.3% (38)
Micelio adherido	59.2% (29)	2% (1)	28.6% (14)	10.2% (5)
Micelio aéreo	24.5% (38)	16.8% (26)	35.5% (55)	23.2% (36)
Conidios	41.8% (51)	11.5% (14)	39.3% (48)	7.4% (9)

Tabla 2 Inmunolocalización y cuantificación de la Cat-2 durante el ciclo de crecimiento y diferenciación de *N. crassa*. La cuantificación se muestra en porcentaje (y en número de partículas de oro / μm^2).



Gráfica 1 Localización de la Cat-1 en las diferentes estructuras celulares durante el ciclo de crecimiento y diferenciación de *N. crassa*, expresado en porcentaje.



Gráfica 2 Localización de la Cat-2 en las diferentes estructuras celulares durante el ciclo de crecimiento y diferenciación de *N. crassa*, expresado en porcentaje.

Lista de reactivos

Los reactivos utilizados fueron de la mayor pureza disponible. Los boratos, cloruro de potasio, acetona, fosfato de sodio, fosfato de potasio, metanol, peróxido de hidrógeno, cloruro férrico, ferricianuro de potasio, ácido acético, acetato de sodio, cloruro de sodio y el etanol fueron de marca Baker. El manitol, lauryl sulfato de sodio, fenil metil sulfonil fluoruro, ácido etilendiamino tetraacético, ditiotreitól, ácido 5-amino salicílico, sacarosa, sulfato de amonio, glicina, trizma base, glicerol, peryodato de sodio, etilenglicol, ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico, desferal, rojo Ponceau, albúmina sérica bovina, anticuerpo peroxidasa y el 4- cloronaftol fueron de marca Sigma. El β -mercaptoetanol, glutaraldehido y el acetato de uranilo fueron de marca Merck. El azul de Coomasie, persulfato de amonio, acrilamida, azul de bromofenol, lauryl sulfato de sodio, reactivo Bradford y el Tween 20 fueron de marca Bio-Rad. El Adyuvante Completo e Incompleto de Freund fueron de marca GIBCO. El agar fue de marca Bioxon. La leche semidescremada fue de marca Svelty. La proteína A oro fue de marca ICN. La resina LR White fue de marca London Resin Company. El formvar fue de marca Electron Microscopy Sciences.