

Catalasas bacterianas: ¿Ancestros funcionales de las catalasas de subunidades grandes de hongos?

Bacterial catalases: Functional ancestors of fungal large subunit catalases?

Daniela Ivette Guerrero Bueno*; Ana Luz Morales Guerrero*; Gloria Angélica Morales Medina*; Gloria Esmeralda Vázquez Delgado*; Haydee Alejandra Pérez Hernández*; José A. Martínez Álvarez*; Naurú Idalia Vargas Maya*; Felipe Padilla Vaca*; Bernardo Franco*

*Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato. Noria Alta S/N, C.P.36050. Guanajuato, Gto. México

di.guerrero@ugto.mx¹; al.morales@ugto.mx²; ga.morales@ugto.mx³; ge.vazquez@ugto.mx⁴; ha.perez@ugto.mx⁵; martinezjose@ugto.mx⁶; ni.vargas@ugto.mx⁷; padillaf@ugto.mx⁸; bfranco@ugto.mx⁹

Resumen

Las especies reactivas de oxígeno son moléculas presentes en la naturaleza y que están involucradas en muchos procesos biológicos importantes. En el caso de las bacterias, dichas moléculas pueden ser muy tóxicas y que son contrarrestadas por proteínas y moléculas antioxidantes. Una especie reactiva de oxígeno importante es el peróxido de hidrógeno, que es contrarrestado por catalasas, las cuales transforman esta molécula en oxígeno y agua. En hongos, las catalasas de subunidades grandes tienen un dominio carboxilo terminal que recientemente se ha descrito que tiene la actividad de chaperona, proteínas involucradas en asistir en el plegamiento de otras proteínas. En este artículo, abordamos algunos aspectos sobre las catalasas bacterianas y proponer que algunas de las catalasas bacterianas están directamente relacionadas con las catalasas de hongos de subunidades grandes que tienen actividad de chaperonas y que pueden estar relacionadas con recuperar la funcionalidad de proteínas dañadas por estrés oxidativo.

Palabras clave: catalasas bacterianas; dominios funcionales; chaperonas; estrés oxidativo; microorganismos patógenos.

Resistencia bacteriana al ambiente y antimicrobianos

El análisis de nuevos mecanismos moleculares de resistencia a insultos ambientales en microorganismos es una tarea de alta relevancia que la ciencia debe abordar, especialmente, para encontrar nuevos blancos terapéuticos. Con el creciente número de géneros bacterianos que se han identificado como resistentes o multirresistentes a antimicrobianos ya son reconocidos como una amenaza, y la búsqueda de nuevas estrategias para su control es una necesidad imperante.

Los mecanismos de resistencia a antimicrobianos ya han sido extensamente caracterizados y se conoce la mayoría de las proteínas y efectores fisiológicos relacionados con la capacidad de sobrevivencia bacteriana, así como la epidemiología de los microorganismos multirresistentes (Livermore, 2003; Serwecińska, 2020). Uno de los problemas asociados con la resistencia a antimicrobianos es que desde la antigüedad, mucho antes del descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming, hay registros del uso de plantas y moho en sociedades como la babilonia y la egipcia, incluso se piensa que antes de estas civilizaciones, y que ahora se sabe son productores de moléculas que inhiben el crecimiento de microorganismos, especialmente bacterias, por lo que la resistencia a estas moléculas no está asociada exclusivamente al uso indiscriminado de antibióticos sino es un proceso evolutivo normal en las comunidades microbianas (Muteeb et al., 2023). Adicionalmente, los elementos genéticos móviles como son los genes de resistencia y los plásmidos que pueden contener dichos genes, son clínicamente importantes ya que el ambiente funciona como una presión de selección que promueve su transmisión y, por tanto, la diseminación de organismos multirresistentes (Chellat et al., 2016; Li et al., 2023).

Nuevos antimicrobianos

El descubrimiento de nuevas moléculas antimicrobianas es un proceso complejo y generalmente tiene limitaciones como son la toxicidad en el hospedero o baja actividad antimicrobiana, aunque esto ha sido mejorado gracias a técnicas computacionales que han acelerado la selección de nuevas moléculas, así como los posibles blancos en las células bacterianas (Lluka & Stokes, 2023). Adicionalmente, el reposicionamiento de fármacos, es decir, buscar actividades antimicrobianas en moléculas que se emplean para el tratamiento de otros padecimientos y que de los cuales se conoce bien su efecto en los humanos así como las dosis y efectos secundarios, es una estrategia que requiere conocer bien, tanto la actividad antimicrobiana que presente el fármaco, como el daño primario en las células expuestas a estas para conocer la posibilidad de el surgimiento de resistencia a moléculas usadas para este fin (Aguilar-Vega et al., 2021).

Actualmente, un área que potencialmente puede controlar la diseminación de microorganismos multirresistentes es el uso de nano-biotecnología (Wahab et al., 2023). El uso de materiales con actividad antimicrobiana en la escala nanométrica es sin duda una herramienta que puede limitar la diseminación de organismos resistentes a antibióticos. Un ejemplo es el uso de nanopartículas de plata antimicrobianas, pero no citotóxicas como las reportadas por Skóra y colaboradores (2021), las cuales demostraron que pueden ser selectivas contra patógenos evitando el daño en la microbiota normal oral pero que pueden usarse en amalgamas para la reparación de dientes sin mostrar daño en el tejido sano.

Sin embargo, existe una creciente preocupación por lo que puede ocurrir en la exposición de un antimicrobiano no convencional, como las nanopartículas, con un microorganismo multirresistente (Xu et al., 2023), ya que el conocimiento que se tiene sobre la respuesta fisiológica ante la exposición de antimicrobianos no convencional es limitado, pero no se puede descartar la posibilidad de tener mecanismos de resistencia. Un ejemplo de cómo se ha aproximado el poder conocer la respuesta a nanomateriales lo han realizado, Liu y colaboradores (2023), quienes usaron proteómica cuantitativa para evaluar el efecto de nanopartículas de plata sobre las células de *Streptococcus suis*. Lo que se encontró es que principalmente disminuye la abundancia relativa de proteínas de membrana y pared celular, pero se sobre expresan las proteínas antioxidantes y esto correlaciona con el aumento de especies reactivas de oxígeno producidas en respuesta a la dosis de nanopartículas empleadas. Se ha postulado que el mecanismo primario de acción de las nanopartículas de plata es mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (Ali et al., 2023), por lo que conocer los mecanismos de respuesta tanto al daño en la pared como en la membrana celular es de suma importancia para conocer posibles mecanismos tanto de daño como de resistencia. Sin embargo, el uso de proteómica para determinar el mecanismo primario de acción de nanopartículas y otros antimicrobianos es costoso y un proceso tardado y que requiere de mucho procesamiento de muestras y de datos.

En nuestro grupo de trabajo hemos analizado el efecto antimicrobiano de nanopartículas de plata sintetizadas usando métodos de química verde y su respuesta celular usando bacterias reporteras (Campo-Beleño et al., 2022), demostrando que las nanopartículas de plata tienen primeramente efecto dañino sobre la membrana celular y en el DNA, teniendo como mecanismo posible la generación de especies reactivas de oxígeno (Campo-Beleño et al., 2022). Una de las grandes ventajas del uso de microorganismos reporteros es que proveen información sobre el mecanismo primario de acción in vivo y pueden evaluarse mediante contacto directo con el antimicrobiano como también hemos reportado previamente (Mora-Garduño et al., 2022).

Mecanismo de resistencia a nanomateriales

Respecto al uso de nanomateriales, ya hay algunos reportes que sugieren la resistencia hacia nanopartículas metálicas. Kamat y colaboradores (2023) abordan el tema y señalan que los mecanismos más probables de resistencia a nanopartículas están las bombas de eflujo, repulsión electrostática de las nanopartículas por cambios en la membrana y pared, formación de biopelículas, producción de enzimas detoxificantes y cambios genéticos. También reportan que en la literatura se han encontrado reportes en los que se puede observar resistencia a nanopartículas en tan solo 90 minutos, dependiendo de las propiedades de las nanopartículas, así como en el microorganismo expuesto.

Panáček y colaboradores (2018) hicieron un hallazgo preocupante. Usando nanopartículas de plata, generaron subpoblaciones resistentes en tan solo ocho pasos consecutivos de cultivo (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) expuestos a concentraciones subletales del nanomaterial. Respecto al mecanismo de resistencia, los autores lo asocian a la capacidad del flagelo bacteriano para agregar las nanopartículas y no a modificaciones genéticas ya que los autores secuenciaron el genoma completo de las poblaciones resistentes sin encontrar mutaciones que expliquen el fenotipo. Los autores demostraron que el fenómeno es evitado mediante el uso de extractos de granada los que evitan la resistencia.

En el grupo de trabajo, haciendo uso de mutantes (colección Keio, (Baba et al., 2006; Yamamoto et al., 2009)) en genes de reparación del DNA, así como de respuesta a estrés oxidativo, se estableció un método para evaluar la sensibilidad de estas mutantes a diferentes antimicrobianos, especialmente nanopartículas de plata (Martínez-Álvarez et al., 2024), con la finalidad de evaluar en qué fondo genético se observa una mayor sensibilidad a los nanomateriales. Se evaluaron primeramente estas mutantes para conocer su fenotipo ante la exposición de agentes conocidos que causan daño en el DNA (mitomicina C) o por estrés oxidativo (peróxido de hidrógeno). En este análisis encontramos que la mutante en la catalasa/peroxidasa KatG mostró sensibilidad extrema a mitomicina C (Figura 1).

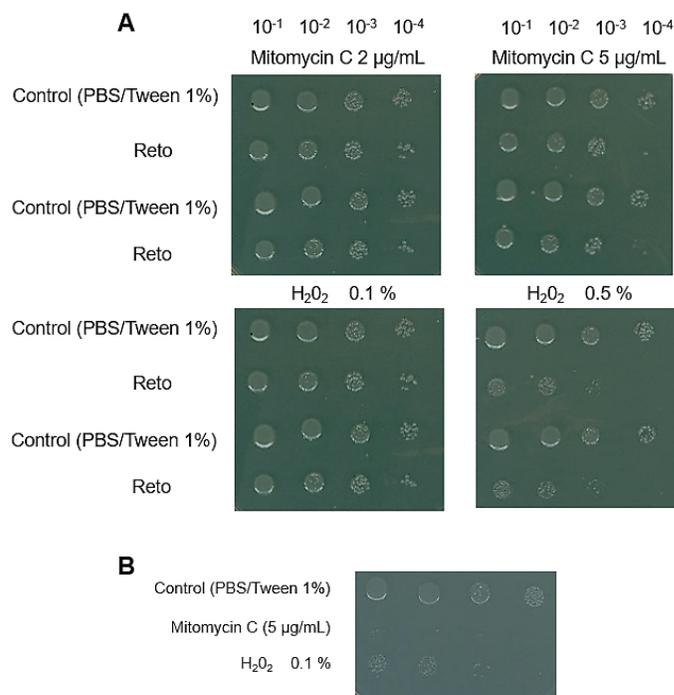


Figura 1. Análisis de sensibilidad de *E. coli* ante mitomicina C y peróxido de hidrógeno. Análisis de sensibilidad hecho con células de la cepa parental BW25113 y la cepa de la colección Keio (Baba et al., 2006; Yamamoto et al., 2009) deficiente en la catalasa/peroxidasa KatG. En el Panel A, análisis por goteo de la cepa parental BW25113 expuesta a dos concentraciones de mitomicina y de peróxido de hidrógeno. De cada condición, se hizo una dilución serial para de cada dilución sembrar en una caja de agar-LB 3 µL de la suspensión celular. Se usó de control PBS y Tween al 1% ya que es el vehículo para la dilución de otros antimicrobianos analizados. En el Panel B, se muestra el análisis de la mutante $\Delta katG$ usando mitomicina y peróxido como se muestra para la cepa parental (Panel A). Figura tomada de Martínez-Álvarez y colaboradores (2024).

En este trabajo, se propone que la sensibilidad a mitomicina C observada en la mutante de la catalasa/peroxidasa katG, está asociada no solamente a la alquilación del DNA, sino también de proteínas, por lo que se exploró alguna explicación plausible a este fenómeno.

Se ha reportado que la mitomicina C y otros agentes alquilantes pueden añadir grupos alquilo a nucleófilos como son los grupos amino, sulfidrilo, hidroxilo, fosfato, carboxilo e imidazol (Konstantinov & Berger, 2008), todos presentes en proteínas. Por tal motivo, la hipótesis propuesta es que la ausencia de la catalasa puede implicar la pérdida de otra actividad enzimática que esté relacionada con la estabilidad y plegamiento de proteínas.

Catalasas, enzimas bifuncionales

El fenotipo observado con mitomicina en la mutante del gen *katG* sugiere que la enzima tiene una actividad adicional. La actividad que se hipotetiza en este trabajo es la actividad de chaperona, proteínas que asisten en el plegamiento de proteínas dañadas. En el 2020, Nava-Ramírez y Hansberg demostraron que en la catalasa de subunidades de gran tamaño del hongo *Neurospora crassa* el dominio carboxilo terminal presenta actividad de chaperona. En 2022, Hansberg y colaboradores demuestran que el dominio carboxilo terminal confiere resistencia a la desnaturalización por calor de catalasas de subunidades pequeñas o de un solo dominio y que las catalasas de subunidades de gran tamaño son el producto de la fusión de una catalasa mono funcional con una chaperona bacteriana.

Para evaluar estas propiedades de las catalasas bacterianas, en el presente trabajo se aborda algunos aspectos evolutivos y estructurales de *KatG* de *Escherichia coli* y elucidar el origen evolutivo del dominio carboxilo terminal de *KatG* que quizá le confiera la capacidad de participar en el plegamiento de otras proteínas durante estrés oxidativo u otros insultos ambientales.

Catalasas y su función biológica

Los organismos patógenos requieren de estrategias para sobrevivir dentro de un hospedero, lo cual no necesariamente está asociado a dañar propiamente al hospedero, sino sobrevivir a los retos que este le impone al organismo invasor. Un ejemplo de estos mecanismos de resistencia son las catalasas. Las catalasas (E.C. 1.11.1.21) son enzimas que se encargan de transformar el peróxido de hidrógeno en agua mediante la reducción de este compuesto usando un donador de electrones que en este caso es el hierro unido a un grupo hemo como parte de la estructura de estas proteínas o el uso de un compuesto orgánico que aún no se ha identificado (Díaz et al., 2012).

La reacción que cataliza estas enzimas se puede resumir en la Figura 2. En la reacción 1, se muestra el paso de dismutación del peróxido de hidrógeno. Esta reacción tiene cuatro pasos (reacciones 2 a la 5). En el primer paso, ocurre la oxidación del grupo hemo que forma un radical oxiferil que resulta en un radical catión de porfirina (reacción dos, compuesto [Cpd] I). El compuesto I es reducido por un segundo peróxido de hidrógeno para regenerar el estado inicial de la enzima produciendo agua y oxígeno (reacción 3). Las catalasas pueden tener actividad de peroxidasa con compuestos orgánicos como se menciona líneas arriba (se muestra en la transición del compuesto I a II en la reacción 4 como AH₂) y el compuesto II puede ser oxidado por otro peróxido de hidrógeno resultando en una inactivación del compuesto III mostrado en la reacción 5 (Vargas-Maya et al., 2022).

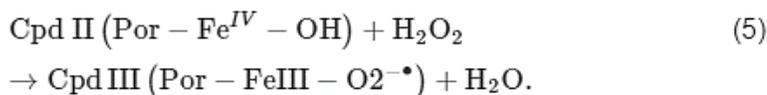
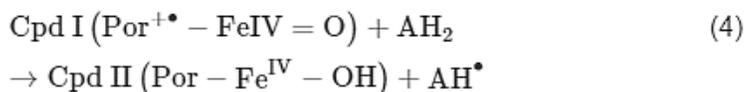
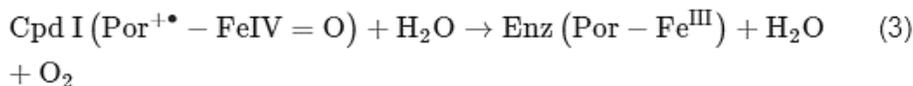
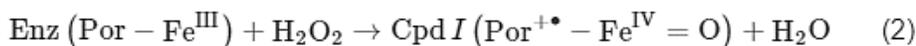


Figura 2. Progresión de reacciones químicas hechas por las catalasas. Abreviaturas: Cpd, compuesto; Enz enzima; Por, porfirina. Tomado de Vargas-Maya et al., 2022.

La eliminación de especies reactivas de oxígeno o ROS es un tema de intensa investigación ya que tiene múltiples implicaciones biomédicas, como son el combate a patógenos, parte importante del sistema inmune innato, envejecimiento, patologías, cáncer, entre otros (Gebicka & Krych-Madej, 2019). En bacterias, existen múltiples sistemas que combaten la presencia de ROS siendo las catalasas y peroxidasas las principales, así como otras enzimas como las oxidasas terminales (Borisov et al., 2021).

Si bien las mutantes en catalasas son viables, son hipersensibles a peróxido de hidrógeno y otros agentes oxidantes. En nuestro grupo de trabajo, encontramos que una mutante de *Escherichia coli* en la principal catalasa es hipersensible a un agente alquilante. Por tanto, en este trabajo, realizaremos estudios bioinformáticos para tratar de elucidar el papel de la catalasa en la resistencia a agentes que principalmente dañan ácidos nucleicos y proteínas mediante alquilación.

KatG de *E. coli* es una proteína de 726 aminoácidos con un peso molecular determinado de 84 kDa (Loewen et al., 1985). En la Figura 3 se muestran algunas de sus propiedades estructurales.

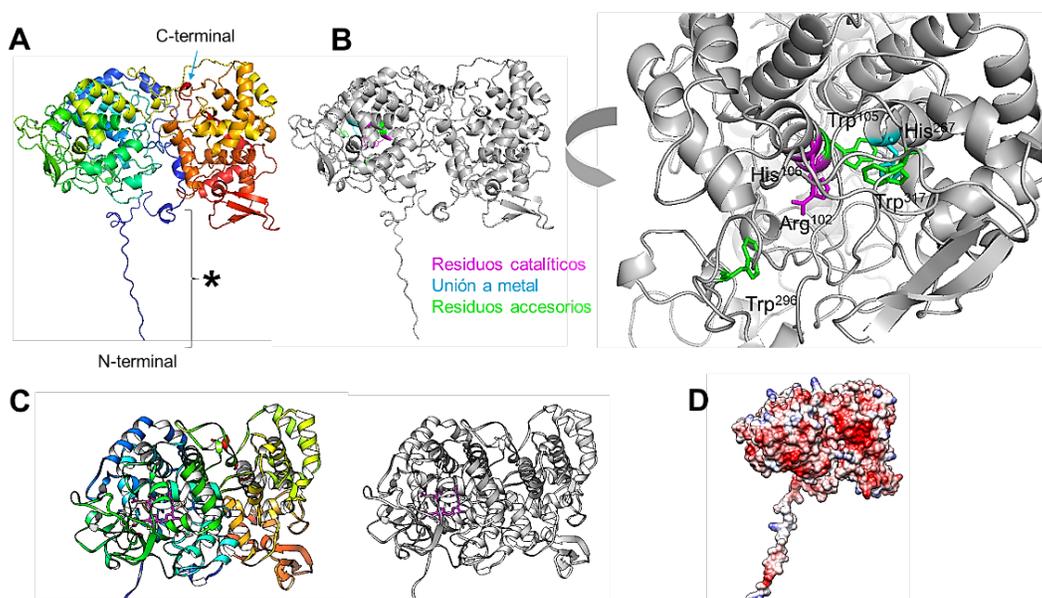
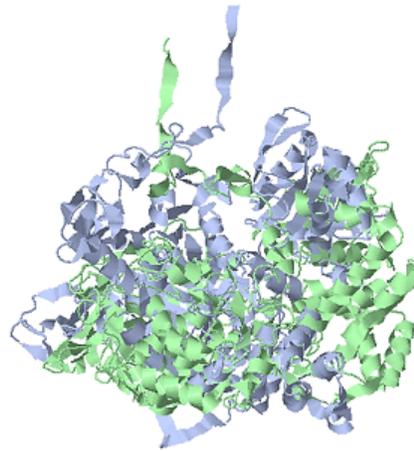


Figura 3. Algunas características estructurales de la catalasa KatG de *E. coli*. En el panel A se muestra en esquema de color de arcoiris la estructura de la proteína, indicando la posición del amino y carboxilo terminales. El asterisco indica una región del extremo amino terminal con aminoácidos repetidos que no se sabe su función y al carecer de una estructura experimental, el modelo determina que es una región desordenada. En el panel B se muestra la estructura de la proteína y en verde y magenta se indican los residuos catalíticos, indicados en un acercamiento y rotación de la estructura a la derecha. Los residuos catalíticos fueron tomados de EcoCyc (<https://ecocyc.org/gene?orgid=ECOLI&id=EG10511#FTRS>). En el panel C se muestra un modelo hecho con AlphaFold 3 (Abramson, J., Adler, J., Dunger, J. et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* (2024). <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>) en el cual contiene el grupo hemo (en morado). Una cualidad muy particular de la proteína se muestra en el panel D, donde la proteína presenta carga positiva en la mayor parte de su superficie.

Un análisis interesante de KatE es que se ha logrado generar versiones trunca mediante proteólisis, se caracterizó funcionalmente y por estructura la región C-terminal de esta proteína, demostrándose que carece de un grupo hemo pero que participa en la catálisis de la proteína (Chelikani et al., 2005). En el caso del dominio C-terminal de la proteína KatG (residuos Tyr422 a Leu726), también por cristalografía, se demostró que carece de un grupo hemo (Carpena et al., 2004). Ahora, las dos enzimas tienen poca homología en secuencia y estructuralmente. En la Figura 4, se muestra un alineamiento estructural de los modelos de AlphaFold2 de ambas proteínas y se indica el valor de RMSD y el promedio de la puntuación del alineamiento promedio (Average TM-score), que, en ambos parámetros, son muy bajos, por lo que las dos proteínas no son estructuralmente similares.



RMSD= 8.58
Average TM-score= 0.27865

Figura 4. Alineamiento estructural entre KatE y KatG, las dos catalasas principales de *E. coli*. El alineamiento se hizo con US-Align y en verde se muestra KatE y en azul KatG. Se indican los dos parámetros de cercanía estructural, el RMSD y el TM-score promedio. Ambos parámetros indican que las dos estructuras no son semejantes.

E. coli produce dos catalasas, KatE y KatG. Una cualidad peculiar de ambas enzimas es que presentan resistencia a proteólisis (Chelikani et al., 2003; Carpena et al., 2002) y resistencia a desnaturalización (Switala et al., 1999). Por lo que estudiar sus propiedades evolutivas y estructurales permitirán conocer su función biológica, así como buscar alternativas para inhibir esta enzima y usarla como blanco terapéutico.

En primera instancia, el análisis evolutivo sugiere que las catalasas bacterianas estudiadas (KatG de *E. coli* y de *Mycobacterium tuberculosis*) revela su posición evolutiva con chaperonas pequeñas como Hsp20 o Hsp31. En la Figura 5 se muestra una reconstrucción filogenética de 53 secuencias usando el método NJ con Bootstrap de 500 iteraciones. Esta reconstrucción filogenética permite inferir estas relaciones evolutivas y que sugieren un punto de partida para nuevos estudios sobre la inhibición de estas enzimas como un blanco terapéutico.

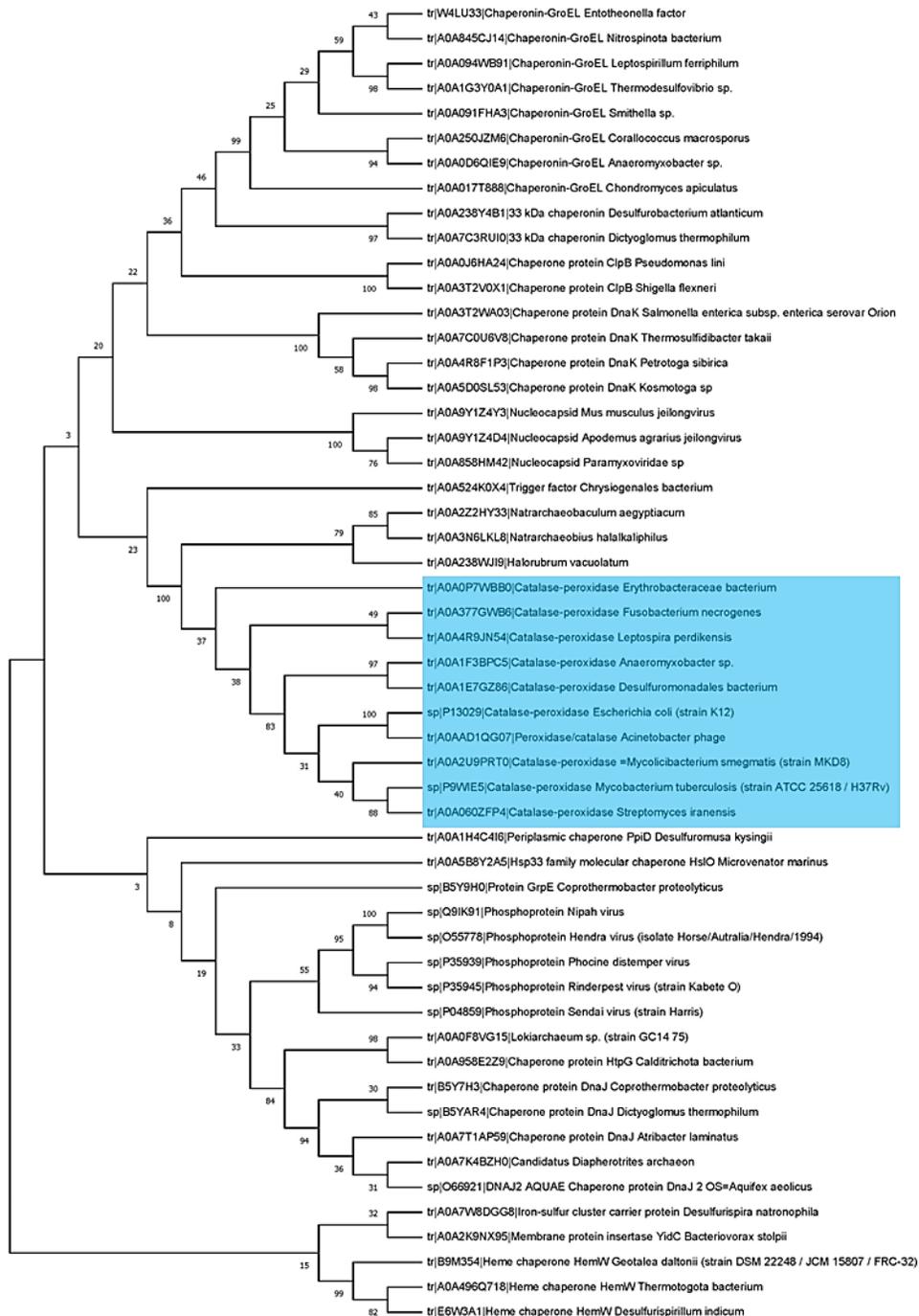


Figura 5. Reconstrucción filogenética usando diferentes secuencias de chaperonas para evaluar su relación evolutiva con las chaperonas bacterianas. En recuadro azul se enmarcan las chaperonas bacterianas elegidas para este análisis mostrando representatividad evolutiva.

Con base en el análisis filogenético, se realizó una comparación estructural de algunos ejemplos cercanos a estas enzimas y como se muestra en la Figura 6, tenemos una buena conservación estructural con las chaperonas. Lo que sugiere una conservación mayor a nivel de estructura que de secuencia.

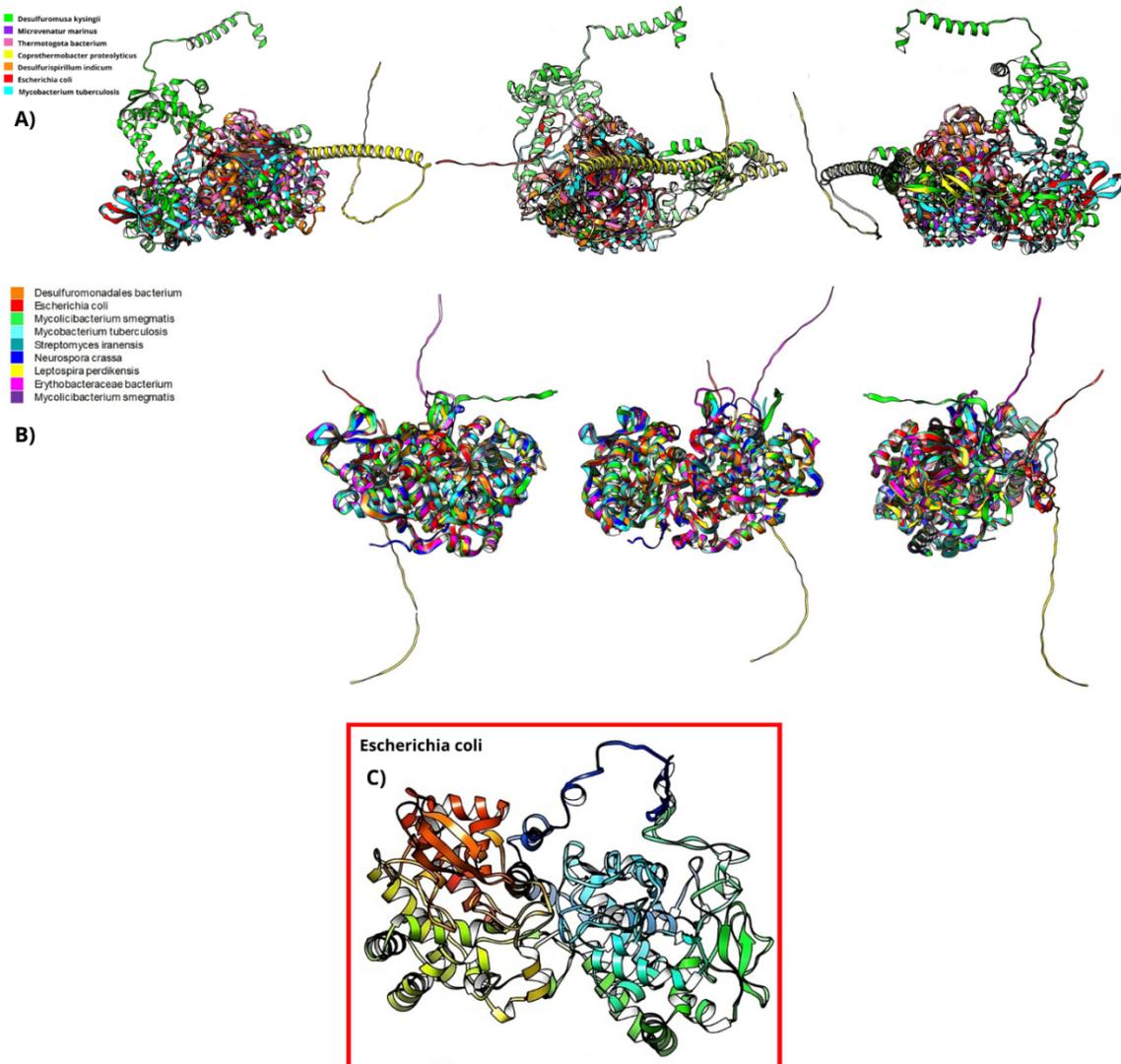


Figura 6. A) Comparación estructural (vista frontal, lateral y posterior) entre las KatG de *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis* y las chaperonas de organismos seleccionados de la figura 5. B) Comparación estructural (vista frontal, lateral y posterior) entre KatG de *E. coli* y *Mycobacterium tuberculosis* y las catalasas de los organismos seleccionados a partir de la figura 5. Los organismos estudiados y su correspondiente figura se encuentran señalados mediante el código de colores en la figura. C) Estructura de KatG de *E. coli*.

Con los datos adicionales que se incluyen en este manuscrito, se puede concluir que es necesario obtener la estructura cristalográfica de KatG de *E. coli* para evaluar en presencia de sustratos si es capaz de unir péptidos o incluso proteínas en su proceso de renaturalización como se demostró para el hongo *N. crassa*. Relacionado con esto, en el 2020, Nava-Ramírez y Hansberg describieron en la catalasa de *N. crassa* la capacidad del dominio carboxilo terminal de tener actividad de chaperona.

Si bien los datos sugieren que efectivamente se trata de una enzima no solo bifuncional para la reducción del peróxido de hidrógeno y como peroxidasa, sino también de catalasa, sin evidencia experimental, sigue siendo algo especulativo. Con base en lo anterior, otra posibilidad de la función del dominio C-terminal es el flujo del sustrato al interior de la enzima como se demostró previamente para la catalasa KatE (Melik-Adamyán et al., 2001). Esto también se demostró en el caso de la catalasa de subunidad grande del hongo *N. crassa* en el que además el canal del sustrato es importante para diferenciar el agua del medio del peróxido de hidrógeno y poder transportarlo al sitio activo (Domínguez et al., 2014).

Tradicionalmente las catalasas se han clasificado como catalasas y catalasas/peroxidasas (Yuan et al., 2021; Vargas-Maya et al., 2022). La diferencia entre ambos tipos de enzimas radica en su capacidad de convertir el peróxido de hidrógeno en agua o bien, el ion superóxido en peróxido de hidrógeno y posteriormente su conversión en oxígeno y agua (Yuan et al., 2021; Vargas-Maya et al., 2022). Hasta el caso de *N. crassa*, que tiene su catalasa de subunidad grande actividad de chaperona, no se había descrito esta actividad en esta familia de enzimas. La única excepción es que KatG tienen la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno en presencia de luz UV (UVB) y, la propuesta es que esto ocurre generando un gradiente electroquímico en los residuos catalíticos pero que, para ese modelo, la enzima debe ser un dímero funcional (Heck et al., 2010). No se puede descartar la posibilidad de que el dominio C-terminal también participe en estas reacciones de transferencia de electrones mediada por luz UV u otras condiciones metabólicas como el NADH como propone Heck y colaboradores (2010) con la generación de ROS mediada por la catalasa, es posible pensar que no necesariamente la enzima tiene actividad de chaperona o bien, es parte del mecanismo dinámico de esta enzima.

Las bacterias se enfrentan a ambientes sumamente cambiantes. Con cambios radicales en la temperatura, las proteínas comienzan a agregarse y esto puede conllevar a la muerte celular. Las chaperonas son proteínas que se encargan de asistir en el plegamiento de otras proteínas, aliviando diversos tipos de estrés celular como son los choques de calor y algunos desnaturizantes como el etanol, contribuyen a la acumulación citoplásmica de proteínas mal plegadas, disgregan los agregados de proteínas, forman complejos en los que participan varias chaperonas y permiten la supervivencia a elevadas temperaturas (Kataridis et al., 2021; Mogk et al., 2003). Ahora, la clase principal de chaperonas son aquellas que están involucradas en disgregar complejos agregados de proteínas, así como degradar aquellas que no tienen la capacidad de renaturalizarse, lo cual es un proceso dependiente de energía en forma de ATP (Kataridis et al., 2021). Existe otro grupo de chaperonas, llamadas Small heat shock proteins o proteínas de choque térmico pequeñas, que no usan ATP y son la primera línea de defensa cuando hay un estrés que afecta a las proteínas, las cuales tienen un dominio conservado que está embebido en una región poco estructurada (Obuchowski et al., 2021). Ahora, estas proteínas tienen mayor plasticidad en sus funciones, ya que pueden participar en fase estacionaria, resistencia a la desecación, pueden regular la formación de biopelículas que son indispensables para la supervivencia, incluso se ha pensado que participan en mantener la integridad de la membrana (Obuchowski et al., 2020). Por todo esto, las chaperonas juegan un papel muy importante en la biología de los seres vivos y más en las bacterias que se enfrentan a un medio sumamente cambiante y que es todavía más relevante en el caso de los organismos patógenos.

Comentarios finales

Las reconstrucciones filogenéticas y el uso de modelos estructurales de proteínas han permitido abrir una brecha importante en el descubrimiento de nuevas funciones de proteínas, identificar blancos de fármacos e incluso rediseñar proteínas para su uso biotecnológico. Hay suficiente evidencia teórica que sugiere que las catalasas grandes de bacterias tienen una posible función dual, como enzimas que permiten eliminar el peróxido de hidrógeno y a la par, asistir en replegar proteínas dañadas por este insulto ambiental.

Para reforzar esta idea, una peculiaridad de la actividad de chaperona de la catalasa de *N. crassa* radica que no solamente asiste en el plegamiento de proteínas, sino también en su desplegamiento lo cual puede facilitar replegar la proteína nuevamente evitando su degradación (Nava-Ramírez et al., 2023). La actividad que permite desplegar una proteína está relacionada con los últimos 17 aminoácidos de la proteína que tiene residuos hidrofóbicos y cargados nada más y forma un asa (Nava-Ramírez et al., 2023). En el caso de KatG no hay una secuencia similar, salvo el extremo amino terminal que es muy extendido y no tiene una estructura definida en las predicciones usando AlphaFold. Queda por resolver cómo es que la enzima de *N. crassa* es capaz de unir el sustrato de una proteína mal plegada y asistir en renaturalizar su estructura nativa, así como el mecanismo en KatG de existir como se predice en este trabajo. Se requiere trabajo experimental haciendo diferentes formas truncas de KatG para evaluar su funcionalidad tanto in vitro como in vivo.

Un aspecto interesante sobre la estructura de KatG es que potencialmente puede formar complejos con otras proteínas. Arifuzzaman y colaboradores (2006) demostraron usando un ensayo masivo de interacción proteína-proteína que KatG es compañera de otras proteínas en *E. coli*. Los autores realizaron diferentes combinaciones como presa y carnada y, en resumen, cuando las enzimas Gss (una glutathionilperoxidasa sintasa), PtsA (una fosfoenopiruvato fosfotransferasa) y FruB, una enzima del sistema PTS específico para fructuosa son usadas como carnada, presentan interacción con KatG. Cuando KatG es usada carnada, presenta interacción con MhpR, un regulador transcripcional, FepE, un transportador de enterobactin y hierro,

YbiH un regulador transcripcional hipotético y NadE, una NH₃ sintetasa dependiente de NAD⁺. Estos datos sugieren que la enzima puede tener diferentes papeles dentro de la célula. Sin embargo, se ha demostrado que la enzima es citoplásmica por lo que potencialmente las interacciones con proteínas de membrana estén relacionadas con el dominio o cara citoplásmica de estas proteínas (Hillar et al., 1999).

Otro aspecto interesante es el enorme arsenal de enzimas antioxidantes en *E. coli*. El regulón de estrés oxidativo compone varias enzimas como son dos catalasas, tres superóxido dismutasas y la que más se ha demostrado es la mejor enzima para remover el peróxido es Ahp o la alquil hidroperóxido reductasa (Seaver & Imlay, 2001).

En este trabajo deseamos atraer la atención de los lectores mediante un ejemplo en *M. tuberculosis* muy interesante en relación con una de las más importantes chaperonas: DnaK. DnaK es una chaperona que participa en el plegamiento de proteínas en el periplasma de bacterias (Wickner S et al, 2021). En el caso del ortólogo de *M. tuberculosis*, esta proteína se ha demostrado está anclada en la membrana celular y tiene una función secundaria que es la unión de plasminógeno y otros componentes de la matriz extracelular (Xolalpa et al., 2007), lo cual hace que tenga un papel importante en la patogenicidad. En el caso de *E. coli* se desconoce si puede tener este papel, pero a nivel de secuencia y estructura son proteínas con una alta homología (datos no mostrados).

Los resultados generados en el grupo de trabajo que señalan una mayor sensibilidad al agente alquilante mitomicina C en una mutante carente del gen katG se complementa con un trabajo de Mulder y colaboradores (1999) que demuestra que en mutantes de *E. coli* deficientes en sistemas de reparación del DNA, se reduce su sensibilidad al ser transformadas con fragmentos de KatG de *M. tuberculosis*. Y lo más interesante es que este sistema experimental demuestra que las mutantes continúan siendo sensibles a luz UV de onda corta, por tanto, debe ser un efecto directo en proteínas y lo que proponemos en este trabajo es que, al estar acoplada la enzima con la actividad de chaperona, esta asiste en plegamiento de proteínas asociadas a la reparación del ADN potencialmente como vecindario funcional.

Finalmente, los métodos computacionales están sujetos a validación experimental y que podamos comprobar que la proteína KatG es capaz de asistir a otras proteínas en su plegamiento en condiciones de estrés celular como lo es la exposición a especies reactivas de oxígeno. Adicionalmente, será de suma importancia determinar la capacidad de complementar una mutante en el gen katG tanto con la proteína completa como con fragmentos de los dos dominios que la componen para tener evidencia funcional de que el dominio C-terminal es efectivamente una chaperona. Con todo esto, es posible que las catalasas que contienen dominios de chaperona pueden ser potencialmente nuevos blancos terapéuticos para microorganismos patógenos como *M. tuberculosis*.

Bibliografía/Referencias

- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J. et al. *Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3*. Nature (2024). <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
- Aguilar-Vega L, López-Jácome LE, Franco B, Muñoz-Carranza S, Vargas-Maya N, Franco-Cendejas R, Hernández-Durán M, Otero-Zúñiga M, Campo-Beleño C, Jiménez-Cortés JG, Martínez-Vázquez M, Rodríguez-Zavala JS, Maeda T, Zurabian R, García-Contreras R. *Antibacterial properties of phenothiazine derivatives against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii strains*. J Appl Microbiol. 2021 Nov;131(5):2235-2243. doi: 10.1111/jam.15109
- Alex Hillar, Larry Van Caesele, Peter C. Loewen. *Intracellular location of catalase-peroxidase hydroperoxidase I of Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters, Volume 170, Issue 2, January 1999, Pages 307–312, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13388.x>
- Ali HM, Karam K, Khan T, Wahab S, Ullah S, Sadiq M. *Reactive oxygen species induced oxidative damage to DNA, lipids, and proteins of antibiotic-resistant bacteria by plant-based silver nanoparticles*. 3 Biotech. 2023 Dec;13(12):414. doi: 10.1007/s13205-023-03835-1.
- Arifuzzaman M, Maeda M, Itoh A, Nishikata K, Takita C, Saito R, Ara T, Nakahigashi K, Huang HC, Hirai A, Tsuzuki K, Nakamura S, Altaf-Ul-Amin M, Oshima T, Baba T, Yamamoto N, Kawamura T, Ioka-Nakamichi T, Kitagawa M, Tomita M, Kanaya S, Wada C, Mori H. *Large-scale identification of protein-protein interaction of Escherichia coli K-12*. Genome Res. 2006 May;16(5):686-91. doi: 10.1101/gr.4527806.

- Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. *Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection*. Mol. Syst. Biol. 2006;2:2006.0008. doi: 10.1038/msb4100050.
- Borisov VB, Siletsky SA, Nastasi MR, Forte E. *ROS Defense Systems and Terminal Oxidases in Bacteria*. Antioxidants (Basel). 2021 May 24;10(6):839. doi: 10.3390/antiox10060839.
- Campo-Beleño C, Villamizar-Gallardo RA, López-Jácome LE, González EE, Muñoz-Carranza S, Franco B, Morales-Espinosa R, Coria-Jimenez R, Franco-Cendejas R, Hernández-Durán M, Lara-Martínez R, Jiménez-García LF, Fernández-Presas AM, García-Contreras R. *Biologically synthesized silver nanoparticles as potent antibacterial effective against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa*. Lett Appl Microbiol. 2022 Sep;75(3):680-688. doi: 10.1111/lam.13759
- Carpena X, Guarné A, Ferrer JC, Alzari PM, Fita I, Loewen PC. *Crystallization and preliminary X-ray analysis of the hydroperoxidase I C-terminal domain from Escherichia coli*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2002 May;58(Pt 5):853-5. doi: 10.1107/s0907444902004201.
- Carpena X, Melik-Adamyan W, Loewen PC, Fita I. *Structure of the C-terminal domain of the catalase-peroxidase KatG from Escherichia coli*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2004 Oct;60(Pt 10):1824-32. doi: 10.1107/S0907444904020621
- Chelikani P, Carpena X, Perez-Luque R, Donald LJ, Duckworth HW, Switala J, Fita I, Loewen PC. *Characterization of a large subunit catalase truncated by proteolytic cleavage*. Biochemistry. 2005 Apr 19;44(15):5597-605. doi: 10.1021/bi047277m
- Chelikani P, Donald LJ, Duckworth HW, Loewen PC. *Hydroperoxidase II of Escherichia coli exhibits enhanced resistance to proteolytic cleavage compared to other catalases*. Biochemistry. 2003 May 20;42(19):5729-35. doi: 10.1021/bi034208j.
- Chellat, M.F.; Raguž, L.; Riedl, R. *Targeting Antibiotic Resistance*. Angew. Chemie Int. Ed. 2016, 55, 6600–6626.
- Díaz A, Loewen PC, Fita I, Carpena X. *Thirty years of heme catalases structural biology*. Arch Biochem Biophys. 2012 Sep 15;525(2):102-10. doi: 10.1016/j.abb.2011.12.011.
- Domínguez L, Sosa-Peinado A, Hansberg W. *How catalase recognizes H₂O₂ in a sea of water*. Proteins. 2014 Jan;82(1):45-56. doi: 10.1002/prot.24352.
- Gebicka L, Krych-Madej J. *The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress*. J Inorg Biochem. 2019 Aug;197:110699. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110699.
- Hansberg W, Nava-Ramírez T, Rangel-Silva P, Díaz-Vilchis A, Mendoza-Oliva A. *Large-Size Subunit Catalases Are Chimeric Proteins: A H₂O₂ Selecting Domain with Catalase Activity Fused to a Hsp31-Derived Domain Conferring Protein Stability and Chaperone Activity*. Antioxidants (Basel). 2022 May 17;11(5):979. doi: 10.3390/antiox11050979.
- Heck DE, Shakarjian M, Kim HD, Laskin JD, Vetrano AM. *Mechanisms of oxidant generation by catalase*. Ann N Y Acad Sci. 2010 Aug;1203:120-5. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05603.x.
- Kamat S, Kumari M. *Emergence of microbial resistance against nanoparticles: Mechanisms and strategies*. Front Microbiol. 2023 Jan 26;14:1102615. doi: 10.3389/fmicb.2023.1102615
- Katkaridis P, Bohl V, Mogk A. *Resisting the Heat: Bacterial Disaggregases Rescue Cells From Devastating Protein Aggregation*. Front Mol Biosci. 2021 May 4;8:681439. doi: 10.3389/fmolb.2021.681439.
- Konstantinov S.M., Berger M.R.. *Alkylating Agents*. In: Offermanns, S., Rosenthal, W. (eds). Encyclopedia of 673 Molecular Pharmacology. 2008, Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-38918-7_178
- Li Y, Li R, Hou J, Sun X, Wang Y, Li L, Yang F, Yao Y, An Y. *Mobilome affect the dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs) of clinical importance into the natural environment*. Environ Res. 2023 Dec 1:117801. doi: 10.1016/j.envres.2023.117801
- Liu B, Liu D, Chen T, Wang X, Xiang H, Wang G, Cai R. *iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of the antibacterial mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant Streptococcus suis*. Front Microbiol. 2023 Nov 15;14:1293363. doi: 10.3389/fmicb.2023.1293363
- Livermore, D.M. *Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact*. Clin. Infect. Dis. 2003, 36, S11–S23.

- Loewen PC, Triggs BL, George CS, Hrabarchuk BE (1985). "Genetic mapping of *katG*, a locus that affects synthesis of the bifunctional catalase-peroxidase hydroperoxidase I in *Escherichia coli*." J Bacteriol 162(2);661-7.
- Lluka T, Stokes JM. *Antibiotic discovery in the artificial intelligence era*. Ann N Y Acad Sci. 2023 Jan;1519(1):74-93. doi: 10.1111/nyas.14930
- Martínez-Álvarez JA, Vicente-Gómez M, García-Contreras R, Wood TK, Ramírez Montiel FB, Vargas-Maya NI, España-Sánchez BL, Rangel-Serrano Á, Padilla-Vaca F, Franco B. *High-Throughput Screening Method Using Escherichia coli Keio Mutants for Assessing Primary Damage Mechanism of Antimicrobials*. Microorganisms. 2024 Apr 14;12(4):793. doi: 10.3390/microorganisms12040793.
- Melik-Adamyan W, Bravo J, Carpena X, Switala J, Maté MJ, Fita I, Loewen PC. *Substrate flow in catalases deduced from the crystal structures of active site variants of HPII from Escherichia coli*. Proteins. 2001 Aug 15;44(3):270-81. doi: 10.1002/prot.1092.
- Mogk A, Deuerling E, Vorderwülbecke S, Vierling E, Bukau B. *Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation*. Mol Microbiol. 2003 Oct;50(2):585-95. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03710.x.
- Mora-Garduño JD, Tamayo-Nuñez J, Padilla-Vaca F, Ramírez-Montiel FB, Rangel-Serrano Á, Santos-Escobar F, Gutiérrez-Corona F, Páramo-Pérez I, Anaya-Velázquez F, García-Contreras R, Vargas-Maya NI, Franco B. *Chromogenic Escherichia coli reporter strain for screening DNA damaging agents*. AMB Express. 2022 Jan 6;12(1):2. doi: 10.1186/s13568-021-01342-1.
- Mulder MA, Nair S, Abratt VR, Zappe H, Steyn LM. *Involvement of the N- and C-terminal domains of Mycobacterium tuberculosis KatG in the protection of mutant Escherichia coli against DNA-damaging agents*. Microbiology (Reading). 1999 Aug;145 (Pt 8):2011-2021. doi: 10.1099/13500872-145-8-2011.
- Muteeb G, Rehman MT, Shahwan M, Aatif M. *Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review*. Pharmaceuticals (Basel). 2023 Nov 15;16(11):1615. doi: 10.3390/ph16111615
- Nava-Ramírez T, Gutiérrez-Terrazas S, Hansberg W. *The Molecular Chaperone Mechanism of the C-Terminal Domain of Large-Size Subunit Catalases*. Antioxidants (Basel). 2023 Mar 30;12(4):839. doi: 10.3390/antiox12040839
- Nava-Ramírez T, Hansberg W. *Chaperone activity of large-size subunit catalases*. Free Radic Biol Med. 2020 Aug 20;156:99-106. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.05.020
- Obuchowski I, Karaš P, Liberek K. *The Small Ones Matter-sHsps in the Bacterial Chaperone Network*. Front Mol Biosci. 2021 May 13;8:666893. doi: 10.3389/fmolb.2021.666893.
- Obuchowski I, Liberek K. *Small but mighty: a functional look at bacterial sHSPs*. Cell Stress Chaperones. 2020 Jul;25(4):593-600. doi: 10.1007/s12192-020-01094-0.
- Panáček A, Kvítek L, Smékalová M, Večeřová R, Kolář M, Röderová M, Dyčka F, Šebela M, Pucek R, Tomanec O, Zbořil R. *Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it*. Nat Nanotechnol. 2018 Jan;13(1):65-71. doi: 10.1038/s41565-017-0013-y
- Seaver LC, Imlay JA. *Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in Escherichia coli*. J Bacteriol. 2001 Dec;183(24):7173-81. doi: 10.1128/JB.183.24.7173-7181.2001.
- Serwecińska, L. *Antimicrobials and Antibiotic-Resistant Bacteria: A Risk to the Environment and to Public Health*. Water 2020, 12, 3313. <https://doi.org/10.3390/w12123313>
- Skóra B, Krajewska U, Nowak A, Dziedzic A, Barylyak A, Kus-Liśkiewicz M. *Noncytotoxic silver nanoparticles as a new antimicrobial strategy*. Sci Rep. 2021 Jun 29;11(1):13451. doi: 10.1038/s41598-021-92812-w.
- Switala J, O'Neil JO, Loewen PC. *Catalase HPII from Escherichia coli exhibits enhanced resistance to denaturation*. Biochemistry. 1999 Mar 30;38(13):3895-901. doi: 10.1021/bi982863z.
- Vargas-Maya NI, Olmedo-Monfil V, Ramírez-Prado JH, Reyes-Cortés R, Padilla-Vaca F, Franco B. *Catalases in the pathogenesis of Sporothrix schenckii research*. PeerJ. 2022 Dec 7;10:e14478. doi: 10.7717/peerj.14478. eCollection 2022.

- Wahab S, Salman A, Khan Z, Khan S, Krishnaraj C, Yun SI. *Metallic Nanoparticles: A Promising Arsenal against Antimicrobial Resistance-Unraveling Mechanisms and Enhancing Medication Efficacy*. Int J Mol Sci. 2023 Oct 4;24(19):14897. doi: 10.3390/ijms241914897
- Wickner S, Nguyen TL, Genest O. *The Bacterial Hsp90 Chaperone: Cellular Functions and Mechanism of Action*. Annu Rev Microbiol. 2021 Oct 8;75:719-739. doi: 10.1146/annurev-micro-032421-035644.
- Xolalpa W, Vallecillo AJ, Lara M, Mendoza-Hernandez G, Comini M, Spallek R, Singh M, Espitia C. *Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen Mycobacterium tuberculosis*. Proteomics. 2007 Sep;7(18):3332-41. doi: 10.1002/pmic.200600876.
- Xu Y, Li H, Li X, Liu W. *What happens when nanoparticles encounter bacterial antibiotic resistance?* Sci Total Environ. 2023 Jun 10;876:162856. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.162856.
- Yamamoto N., Nakahigashi K., Nakamichi T., Yoshino M., Takai Y., Touda Y., Furubayashi A., Kinjo S., Dose H., Hasegawa M., et al. *Update on the Keio collection of Escherichia coli single-gene deletion mutants*. Mol. Syst. Biol. 2009;5:335. doi: 10.1038/msb.2009.92
- Yuan F, Yin S, Xu Y, Xiang L, Wang H, Li Z, Fan K, Pan G. *The Richness and Diversity of Catalases in Bacteria*. Front Microbiol. 2021 Mar 19;12:645477. doi: 10.3389/fmicb.2021.645477