



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO  
DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

Purificación, características bioquímicas y localización  
intracelular de una dihidrodiol deshidrogenasa  
inducible por fenantreno en *Mucor circinelloides* cepa  
YR-1

## **T E S I S**

Que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias (Biología)

P R E S E N T A

BIOL. JAZMIN ARELI ALVAREZ COPADO

Guanajuato, Gto., diciembre de 2017

El presente trabajo de tesis de Doctorado se realizó en el Departamento de Biología de la División de Ciencias naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato, bajo la dirección del Dr. Bernardo Franco Bárcenas, con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT), apoyos CONACyT/CIBIOGEM 264456 y CB2012 182671 . DAIP/Guanajuato Convocatoria Insitucional 2016 – 2017. Apoyo Institucional para fortalecer la excelencia académica convenio 89/2016. Se agradece la beca otorgada por el CONACyT para la realización de este trabajo

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Roberto Zazueta, QFB. Areli Durón y al Dr. Bernardo Franco; ya que sin su apoyo y guía este trabajo no se hubiera realizado.

A los miembros del comité tutorial, por compartir su experiencia a través de valiosos consejos y observaciones.

A mi familia y amigos que son un gran apoyo y motivación en todos los aspectos de mi vida.

A mí; ya que aun cuando a veces no veía el camino, valió la pena cada paso recorrido. El cariño y las enseñanzas de quienes me acompañaron es algo que llevaré el resto de mi vida.

"Me lo contaron y lo olvidé; lo vi y lo entendí; lo hice y lo aprendí"

— Confucio

**CONTENIDO**

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
Hidrocarburos policíclicos aromáticos.....	2
Exposición y salud humana.....	2
Degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos.....	8
Dihidrodiol deshidrogenasas .....	12
Localización del metabolismo de HPAs .....	13
Modelo de estudio .....	14
ANTECEDENTES.....	15
JUSTIFICACIÓN .....	19
OBJETIVOS .....	19
Objetivo general .....	19
Objetivos específicos .....	19
METODOLOGÍA .....	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
Almacenamiento de HPAs en células completas .....	29
Caracterización de la actividad <i>cis</i> -DD por zimogramas .....	35
Determinación del punto isoeléctrico.....	39
Determinación de glicosilación de la enzima PDD1 .....	40
Purificación parcial de la actividad PDD1 y cálculo de constantes de unión de sustrato y cofactor por la enzima PDD1 .....	41
Constantes de unión de la enzima PDD1 a su cofactor NADP <sup>+</sup> .....	44
Determinación del mecanismo de reacción.....	48
Estimación del peso molecular.....	51
Obtención de anticuerpos contra la enzima PDD1 .....	51
Peso molecular de la enzima PDD1 en conformación nativa.....	54
Peso molecular de las subunidades de la enzima PDD1 y probable estructuración.....	59
Constante catalítica y eficiencia del sistema .....	60
Identificación de la proteína candidata con actividad de PDD1 por espectrometría de masas MALDI-TOF .....	61
Localización subcelular de la actividad PDD1.....	69
CONCLUSIONES .....	73
PERSPECTIVAS .....	74
BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	81

## ABREVIATURAS

DD	dihidrodiol deshidrogenasa
DMSO	Dimetil sulfóxido
FDA	Food and Drug Administration
FEN	fenantreno
GLU	glucosa
H	constante de Hill
HPAs	hidrocarburo policíclico aromático
IPCS	International Programme on Chemical Safety
<i>K<sub>app</sub></i>	constante aparente de equilibrio
<i>K<sub>cat</sub></i>	constante catalítica
<i>K<sub>m</sub></i>	constante de Michaelis
<i>K<sub>r</sub></i>	coeficiente de retardo
MEB	microscopía electrónica de barrido
MET	microscopía electrónica de transmisión
MMSP	medio mínimo de sales y peptona
Mr	movilidad relativa
NAF	naftaleno
ndd	actividad deshidrogenasa medida con el diol de naftaleno, , puede ser <i>cis</i> -ndd o <i>trans</i> -ndd
NDD	enzima naftalendiol deshidrogenasa
PDD	enzima fenantrendiol deshidrogenasa
pI	punto isoeléctrico
<i>V<sub>max</sub></i>	velocidad máxima para una concentración de sustrato $\rightarrow\infty$
WHO	World Health Organization

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta propuesta para el catabolismo microbiano de HPAs .....	9
Figura 2. Vía de activación de las dihidrodiol deshidrogenasas.....	10
Figura 3. Ruta de degradación intracelular propuesta para fenantreno mediante el sistema enzimático de citocromos P450.....	11
Figura 4. Diferencias morfológicas que presenta la cepa YR-1 cuando crece en presencia de diferentes fuentes de carbono .....	15
Figura 5. Actividad dihidrodiol deshidrogenasa presente en fracciones citosólicas de <i>M. circinelloides</i> YR-1 crecido en distintas fuentes de carbono.....	16
Figura 6. Inmunolocalización de la NDD y peroxidasa en células crecidas en naftaleno....	17
Figura 7. Tinción negativa de muestras de vesículas separadas por un gradiente de sacarosa. ....	18
Figura 8. Microscopía de fluorescencia del micelio de la cepa YR-1 cuando se crece en presencia de fenantreno .....	31
Figura 9. Microscopía de fluorescencia del micelio de la cepa YR-1 cuando se crece en presencia de naftaleno y de los controles .....	32
Figura 10. Gráfico de caja y bigotes para representar los valores de fluorescencia de la cepa YR-1 cultivada en distintas condiciones. ....	33
Figura 11. Microscopía de fluorescencia del micelio de la cepa YR-1 cuando se crece en presencia de pireno .....	34
Figura 12. Microscopía de fluorescencia, en tres distintas profundidades, del micelio de la cepa YR-1 cuando se crece en presencia de pireno al 0.3% durante 24h.....	35
Figura 13. Enzimas con actividad <i>cis</i> -nnd inducidas por la presencia de tres distintas fuentes de carbono. ....	36
Figura 14. Zimograma de las actividades <i>cis</i> - y <i>trans</i> - nnd.....	37
Figura 15. Efecto del pH sobre la detección de la actividad <i>cis</i> - nnd.....	38
Figura 16. Efecto de la temperatura sobre la detección de la actividad <i>cis</i> - nnd.....	38
Figura 17. Determinación de punto isoeléctrico de la enzima PDD1 .....	39
Figura 18. Proteínas glicosiladas presentes en el extracto libre de células cultivadas en fenantreno. ....	40
Figura 19. SDS-PAGE de la enzima PDD1 purificada a partir de geles al 6% sin teñir.....	42
Figura 20. Representación no lineal y lineal de la unión al sustrato <i>trans</i> . ....	43
Figura 21. Representación no lineal de la unión al sustrato <i>cis</i> -naftalendiol. ....	44
Figura 22. Representación de los datos de unión al NADP+ cuando se emplea sustrato <i>trans</i> . ....	45
Figura 23. Representación de los datos de unión al NADP+ cuando se emplea sustrato <i>cis</i> . ....	46
Figura 24. Representación gráfica de la inhibición por producto final. ....	49
Figura 25. Modelo del mecanismo propuesto de reacción de la enzima PDD1 .....	50
Figura 26. Titulación de anticuerpos anti-PDD1.....	52

Figura 27. Reconocimiento en la banda de actividad <i>cis</i> - ndd por los anticuerpos, tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes. ....	53
Figura 28. Perfil de proteína y actividad <i>cis</i> -ndd en fracciones separadas por cromatografía de exclusión molecular en Bio-gelA 0.5M.....	55
Figura 29. Inmunodetección de la PDD en fracciones separadas por cromatografía de exclusión molecular en la resina Sephacryl S-300. ....	56
Figura 30. Geles de acrilamida representativos, empleados para generar los gráficos de Ferguson. ....	57
Figura 31. Gráfico de Ferguson para las proteínas estándar y la enzima PDD1. ....	58
Figura 32. Curva estándar para la determinación de peso molecular por el método de Ferguson. ....	58
Figura 33. Gel de acrilamida en gradiente de 4 a 12%.....	59
Figura 34. Curva estándar para la determinación de peso molecular mediante gel de poliacrilamida en gradiente .....	59
Figura 35. SDS-PAGE de PDD1 purificada de zimogramas .....	60
Figura 36. SDS-PAGE de la muestra usada en el análisis MALDI-TOF. ....	63
Figura 37. Modelo tridimensional de la proteína S2JH17.....	68
Figura 38. Salida de datos del análisis en el sitio PROSITE.....	68
Figura 39. Distribución de actividad ADH, <i>cis</i> -ndd y peroxidasa en gradientes continuos de sacarosa del 10 al 60%.....	71
Figura 40. Esquema propuesto para cubrir las perspectivas.....	74

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. HPAs parentales y derivados alquilo considerados por la IPCS para la evaluación de toxicología. ....	3
Tabla 2. Niveles de HPAs medidos en distintas fuentes ambientales .....	8
Tabla 3. Técnicas de para el estudio de equilibrio múltiple y cinética enzimática .....	42
Tabla 4. Valores calculados para las constantes de unión de los sustratos <i>cis</i> y <i>trans</i> .....	43
Tabla 5. Valores calculados para las constantes de unión del NADP <sup>+</sup> , cuando se usan los dos distintos sustratos, <i>cis</i> y <i>trans</i> .....	47
Tabla 6. Valores de Kapp del NADP <sup>+</sup> para las estructuras T y R .....	48
Tabla 7. Valores calculados para las constantes de unión del sustrato <i>trans</i> cuando se añade 1,2-dihidroxinaftaleno como producto final.....	49
Tabla 8. Identidad y funciones descritas para las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. ....	65
Tabla 9. Péptidos identificados mediante la espectrometría de masas. ....	66
Tabla 10. Características predichas a partir de las secuencias de aminoácidos. ....	67

## RESUMEN

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) son compuestos orgánicos, hidrofóbicos, que se encuentran formados por dos o más anillos de benceno. Son altamente tóxicos y pueden desencadenar procesos mutagénicos con efectos cancerígenos. Una forma de eliminar esos contaminantes del medio, es mediante el uso de microorganismos mediante un proceso denominado bioremediación. Así, la cepa YR-1 de *Mucor circinelloides* fue aislada de un sitio contaminado con petróleo como un posible organismo degradador de HPAs, este microorganismo es un hongo dimorfo con crecimiento micelial en presencia de oxígeno o como esferas levaduriformes en anaerobiosis. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado la capacidad del hongo para crecer en presencia de hidrocarburos tanto alifáticos como aromáticos, además de utilizarlos como fuente de carbono y energía. En el presente trabajo, con la meta de añadir más información al proceso de resistencia y metabolismo de HPAs en *M.circinelloides* YR-1, se analizó la acumulación de naftaleno, fenantreno y pireno en estas células mediante microscopía de fluorescencia. Así mismo, se estandarizó la metodología y se determinaron las condiciones óptimas, para detectar, mediante zimogramas, la actividad *cis*-naftalendiol (*cis*-ndd) de extractos libres de células crecidas con fenantreno. Además, se realizó la purificación parcial y caracterización bioquímica de una probable oxidoreductasa inducible por fenantreno que probablemente es la responsable de la deshidrogenación, denominada PDD1, la cual incluyó la estimación de las constantes de unión para los sustratos de la enzima. Los resultados observados sugieren que la enzima PDD1 es capaz de usar los sustratos *cis* y *trans*-naftalendiol. También se realizó el análisis de la enzima purificada parcialmente mediante espectrometría de masas en un sistema MALDI-TOF. Se encontró que, en el homogenado había más de una proteína; una de ellas identificada como S2JH17 presenta el plegamiento de Rossmann necesario para llevar a cabo la actividad DD y característico de las enzimas que unen NAD ó NADP. Estos datos sugieren que la proteína S2JH17 es la mejor candidata a ser la enzima PDD1. Finalmente se realizaron experimentos preliminares para determinar la localización intracelular de la actividad *cis*-ndd, por medio de gradientes isopícnicos de sacarosa. Los resultados sugieren la localización de dicha actividad en una población microvesicular que sedimenta a  $4 \times 10^3$  S.



## INTRODUCCIÓN

### **Hidrocarburos policíclicos aromáticos**

De acuerdo con el IPCS (International Programme on Chemical Safety), el término HPAs hace referencia a una gran cantidad de compuestos orgánicos que contienen dos o más anillos aromáticos fusionados, formados únicamente por átomos de carbono e hidrógeno, dispuestos de forma lineal angular o en arreglos de racimo (WHO, 1998).

Se encuentran de forma natural como productos de combustión, derivados de combustibles fósiles y procesos de transformación (Neff, 2002; Hylland, 2006). Son sólidos a temperatura ambiente con puntos de fusión y ebullición relativamente altos, baja presión de vapor y una muy baja solubilidad en agua que tiende a disminuir conforme aumenta el peso molecular. Además solubles en varios solventes orgánicos y altamente lipofílicos. Se les considera químicamente inertes, pero pueden sufrir fotodescomposición y reaccionar con óxidos de nitrógeno, ácido nítrico, óxidos de azufre, óxido sulfúrico, ozono y radicales hidroxilos; cabe señalar que los dos últimos están clasificados como especies reactivas de oxígeno (ROS) (Peng *et al.*, 2008; Seo *et al.*, 2009; Ghosal, *et al.*, 2016).

Aunque en el ambiente se les encuentra como mezclas, el IPCS considera para evaluación toxicológica los HPAs enlistados en la Tabla 1, así como algunas características reportadas para cada uno de ellos (WHO, 1998).

### **Exposición y salud humana**

Los HPAs son absorbidos a través del tracto respiratorio, gastrointestinal y piel. Se distribuyen ampliamente en el organismo después de la exposición, especialmente en órganos ricos en lípidos (Abdel-Shafya y Mansourb, 2015). El metabolismo de los HPAs es complejo; en general, los compuestos parentales son convertidos vía intermediarios epóxidos a fenoles, dioles y tetroles, los cuales pueden conjugarse con ácido sulfúrico, glucorónico o glutatión.



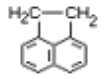
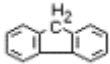
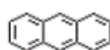
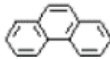
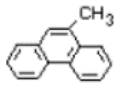
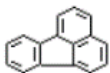
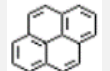
Nombre y estructura	PM	Fórmula	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Presión de vapor (Pa a 25°C)	Densidad	Solubilidad en agua a 25°C (µg/litro)	Genotoxicidad	Cancerogenicidad
Naftaleno 	128.2	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	81	217.9	10.4	1.154	3.17 x10 <sup>7</sup>	-	(?)
Acenaftileno 	152.2	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>	92 – 93		0.89	0.899		(?)	(?)
Acenafteno 	154.2	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>	95	279	0.29	1.024	3.93 x10 <sup>3</sup>	(?)	(?)
Fuoreno 	166.2	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	115 – 116	295	0.09	1.203	1.98 x10 <sup>3</sup>	-	-
Antraceno 	178.2	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	216.4	342	8.0 x10 <sup>-4</sup>	1.283	73	-	-
Fenantreno 	178.2	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	100.5	340	0.016	0.98	1.29 x10 <sup>3</sup>	(?)	(?)
1-metilfenantreno 	192.3	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub>	123	354 – 355			255 (24°C)	+	(-)
Fluoranteno 	202.3	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	108.8	375	1.2 x10 <sup>-3</sup>	1.252	260	+	(+)
Pireno 	202.3	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	150.4	393	6.0 x10 <sup>-4</sup>	1.271	135	(?)	(?)

Tabla 1. HPAs parentales y derivados alquilo considerados por la IPCS para la evaluación de toxicología. Tabla realizada con datos reportados por WHO en el EHC 202 (1998).

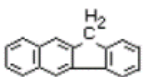
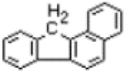

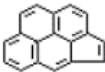
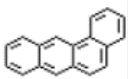
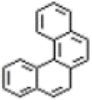
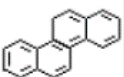
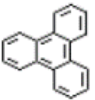
Nombre y estructura	PM	Fórmula	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Presión de vapor (Pa a 25°C)	Densidad	Solubilidad en agua a 25°C (µg/litro)	Genotoxicidad	Cancerogenicidad
Benzo[b]fluoreno 	216.3	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub>	213.5	401 – 402		1.226	2	(?)	(?)
Benzo[a]fluoreno 	216.3	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub>	189 – 190	399 – 400			45	(?)	(?)
Benzo[ghi]fluoranteno 	226.3	C <sub>18</sub> H <sub>10</sub>	128.4	432		1.345		(+)	(-)
Ciclopenta[cd]pireno 	226.3	C <sub>18</sub> H <sub>10</sub>	170	439				+	+
Benzo[a]antraceno 	228.3	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	160.7	400	2.8 x10 <sup>-5</sup>	1.226	14	+	+
Benzo[c]fenantren 	228.3	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	66.1		8.4 x10 <sup>-5</sup> (20°C)	1.265		(+)	+
Criseno 	228.3	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	253.8	448		1.274	2	+	+
Trifenileno 	228.3	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	199	425		1.3	43	+	(-)

Tabla 1 (continuación). HPAs parentales y derivados alquilo considerados por la IPCS para la evaluación de toxicología. Tabla realizada con datos reportados por WHO en el EHC 202 (1998).

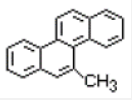
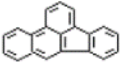
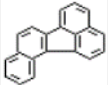
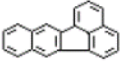
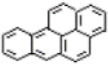


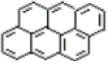
Nombre y estructura	PM	Fórmula	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Presión de vapor (Pa a 25°C)	Densidad	Solubilidad en agua a 25°C (µg/litro)	Genotoxicidad	Cancerogenicidad
5-Metilcriseno 	242.3	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub>	117.1	458			62 (27°C)	+	+
Benzo[b]fluoranteno 	252.3	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	168.3	481	6.7 x10 <sup>-5</sup> (20°C)		1.2 (20°C)	+	+
Benzo[j]fluoranteno 	252.3	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	165.4	480	2.0 x10 <sup>-6</sup>		2.5	+	+
Benzo[k]fluoranteno 	252.3	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	215.7	480	1.3 x10 <sup>-8</sup> (20°C)		0.76	+	+
Benzo[a]pireno 	252.3	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	178.1	496	7.3 x10 <sup>-7</sup>	1.351	3.8	+	+
Benzo[e]pireno 	252.3	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	178.7	493	7.4 x10 <sup>-7</sup>		5.07 (23°C)	+	?
Perileno 	252.3	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	277.5	503		1.35	0.4	+	(-)
Antantreno 	276.3	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	264	547		1.39		(+)	+

Tabla 1 (continuación). HPAs parentales y derivados alquilo considerados por la IPCS para la evaluación de toxicología. Tabla realizada con datos reportados por WHO en el EHC 202 (1998).


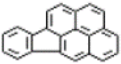
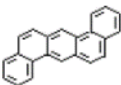

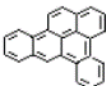
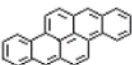
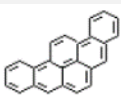
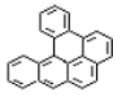
Nombre y estructura	PM	Fórmula	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Presión de vapor (Pa a 25°C)	Densidad	Solubilidad en agua a 25°C (µg/litro)	Genotoxicidad	Cancerogenicidad
Benzo[ghi]perileno 	276.3	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	278.3	545	1.4 x10 <sup>-8</sup>	1.329	0.26	+	-
Indeno[1.2.3-cd]pireno 	276.3	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	163.6	536	1.3 x10 <sup>-8</sup> (20°C)		62	+	+
Dibenz[a.h]antraceno 	278.4	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	266.6	524	1.3 x10 <sup>-8</sup> (20°C)	1.282	0.5 (27°C)	+	+
Coroneno 	300.4	C <sub>24</sub> H <sub>14</sub>	439	525	2.0 x10 <sup>-10</sup>	1.37	5.4	(+)	(?)
Dibenzo [a.e] pireno 	302.4	C <sub>24</sub> H <sub>14</sub>	244.4	592				+	+
Dibenzo [a.h] pireno 	302.4	C <sub>24</sub> H <sub>14</sub>	317	596				(+)	+
Dibenzo [a.i] pireno 	302.4	C <sub>24</sub> H <sub>14</sub>	282	594	3.2 x10 <sup>-10</sup>		0.17	+	+
Dibenzo [a.l] pireno 	302.4	C <sub>24</sub> H <sub>14</sub>	162.4	595				(+)	+

Tabla 1 (continuación). HPAs parentales y derivados alquilo considerados por la IPCS para la evaluación de toxicología. Tabla realizada con datos reportados por WHO en el EHC 202 (1998).

Muchos metabolitos y sus conjugados son excretados a través de la orina o heces fecales, pero algunos son activados a especies que se unen a DNA, principalmente diol epóxidos, y pueden desencadenar procesos mutagénicos capaces de generar efectos cancerígenos (WHO, 1998).

Además, se ha observado que algunos de dichos compuestos pueden inducir necrosis bronquial, mielotoxicidad, cambios hemolinfáticos, anemia, hiperqueratosis, toxicidad ocular, inmunosupresión, teratogenicidad, muerte fetal, malformaciones y problemas reproductivos (WHO, 1998).

Debido a la naturaleza de los HPAs, se les puede encontrar en cualquier sitio aun cuando la actividad antropogénica sea baja o nula (Ghosal *et al.*, 2016)) (Tabla 2). Sin embargo, existen sitios donde los niveles de HPAs son mayores. Se ha observado una mayor exposición a dichos compuestos en personas que están en contacto con aire contaminado, humo de chimeneas y cocinas, humo de tabaco, operadores de equipo en refinerías, personas en contacto con operaciones de pavimentación, trabajadores de plantas de aluminio y minería (WHO, 1998; Ghosal *et al.*, 2016).

Los alimentos crudos, normalmente no contienen HPAs pero pueden llegar a contenerlos al ser cultivados en suelos contaminados, por deposición de partículas aéreas o formarse al ser procesados, rostizados, cocinados o fritos, llegando a una concentración de 0.01 a 10 µg/kg; en productos ahumados se han detectado en niveles superiores a 100 µg/kg (WHO, 1998; Choi, 2010).

La FDA cuenta con normativas para regular la concentración de HPAs en alimentos de origen marino debido a la exposición de estos productos en derrames de petróleo (Gratz *et al.*, 2010). Además, enlista más de 15 HPAs presentes en productos y humo de tabaco; cataloga a todos ellos como carcinógenos, algunos como tóxicos respiratorios y cardiovasculares, y tóxicos reproductivos y de desarrollo (U. S. FDA, 2012).

Aunque los HPAs pueden sufrir adsorción, volatilización, fotólisis, y degradación química, la acción microbiana es el principal factor para el proceso de degradación, por lo que se ha dado especial atención a la elucidación de este proceso; se han identificado algas, bacterias y hongos capaces de realizarlo (Cerniglia y Yang, 1984; Peng *et al.*, 2008; Seo *et al.*, 2009; Das y Chandran, 2011).

Fuente	Concentración de HPAs
Zonas no contaminadas	Agua 50 ng/l Suelo 5-100 µg/kg
Áreas urbanas	Agua 1-30 ng/m <sup>3</sup>
Ciudades con tráfico pesado de vehículos de motor	Aire >200 ng/m <sup>3</sup> Suelo 2-5 mg/kg
Túneles vehiculares	Aire 1-50 ng/m <sup>3</sup>
Estaciones de tren subterráneo	Aire >20 ng/m <sup>3</sup>
Sitios cercanos a industrias	Aire 1-10 ng/m <sup>3</sup> Suelo >1 g/kg
Ríos contaminados	>6000 ng/l
Sitios con calefacción o humo de tabaco	1-100 ng/m <sup>3</sup>
Ingesta por alimentos	0.10-10 µg/día/persona

Tabla 2. Niveles de HPAs medidos en distintas fuentes ambientales

### Degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos

Para disertar el proceso de degradación biológica de los HPAs se han empleado naftaleno, fluoreno, fluoranteno, pireno, benzo[a]pireno y fenantreno, entre otros (Peng *et al.*, 2008); en estos estudios se identificaron los productos de degradación de los HPAs aislándolos mediante HPLC y caracterizándolos por espectrometría de masas, dicroísmo circular y resonancia magnética nuclear; con ello se estableció un modelo general de degradación biológica de estos compuestos (Tabak *et al.*, 1964; Laborde y Gibson, 1977; Cerniglia *et al.*, 1979; Cerniglia y Yang, 1984). También se han aislado algunas enzimas involucradas

en el catabolismo de los HPAs e identificado algunos genes, principalmente en bacterias (Hara *et al.*, 1991; Sato *et al.*, 1994; Arimitsu *et al.*, 1999; Asada *et al.*, 2000; Aoki *et al.*, 2001; Jouanneau y Meyer, 2006; Kim *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2006; Carbone *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2008; Seo *et al.*, 2009).

Se han identificado tres fases principales en la biotransformación de compuestos xenobióticos:

- I. Fase de activación. Implica oxidaciones, reducciones o hidrólisis que convierten los compuestos en metabolitos más polares (Jacobs *et al.*, 1991; Warshawsky *et al.*, 1995; Bezalel *et al.*, 1997).
- II. Fase de conjugación. Formación de aductos menos tóxicos y más solubles, mediante metilación, glucuronidación, acetilación o por conjugación con moléculas endógenas (Warshawsky *et al.*, 1995; Casillas *et al.*, 1996; Bezalel *et al.*, 1997).
- III. Fase de asimilación. Implica la incorporación de los HPAs conjugados en organelos u otras estructuras del microorganismo (Warshawsky *et al.*, 1995; Bezalel *et al.*, 1997).

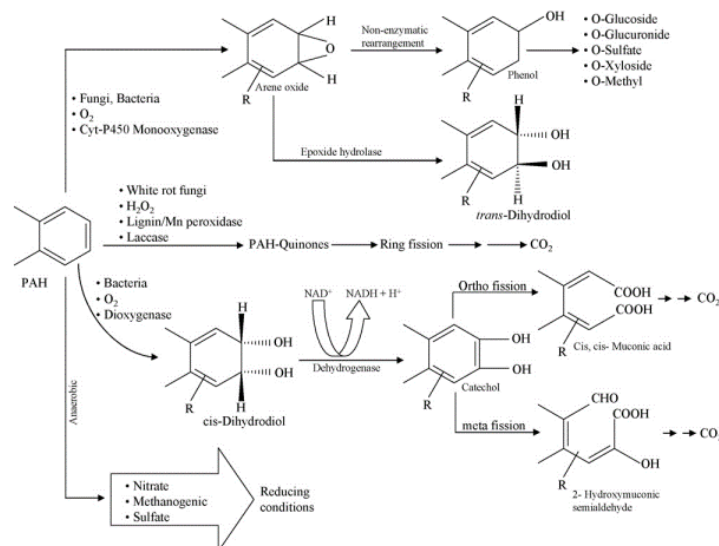


Figura 1. Ruta propuesta para el catabolismo microbiano de HPAs (Haritash y Kaushik, 2009).

La habilidad de los microorganismos para catalizar la fisión enzimática de un núcleo de benceno depende de la presencia de al menos dos sustituyentes hidroxilo en el anillo



aromático (Figura 1). Cuando un anillo aromático ya contiene un solo sustituyente hidroxilo, la adición enzimática de un segundo grupo hidroxilo es usualmente catalizada en una reacción monooxigenasa-dependiente, en donde un átomo de oxígeno molecular es incorporado en el sustrato y el otro átomo de oxígeno es reducido a agua (Rogers y Gibson, 1977; Atlas y Hazen, 2011). Las bacterias oxidan inicialmente los HPAs por incorporación de dos átomos de oxígeno molecular en el núcleo para formar *cis*-dihidrodiol. Una vez formados los dihidrodiol, las dihidrodiol deshidrogenasas son las encargadas de convertir el compuesto en un catecol que posteriormente será convertido en intermediarios del ciclo de ácido cítrico, conduciendo de esta manera a la degradación total de la molécula (Rogers y Gibson, 1977; Goyal y Zylstra, 1996).

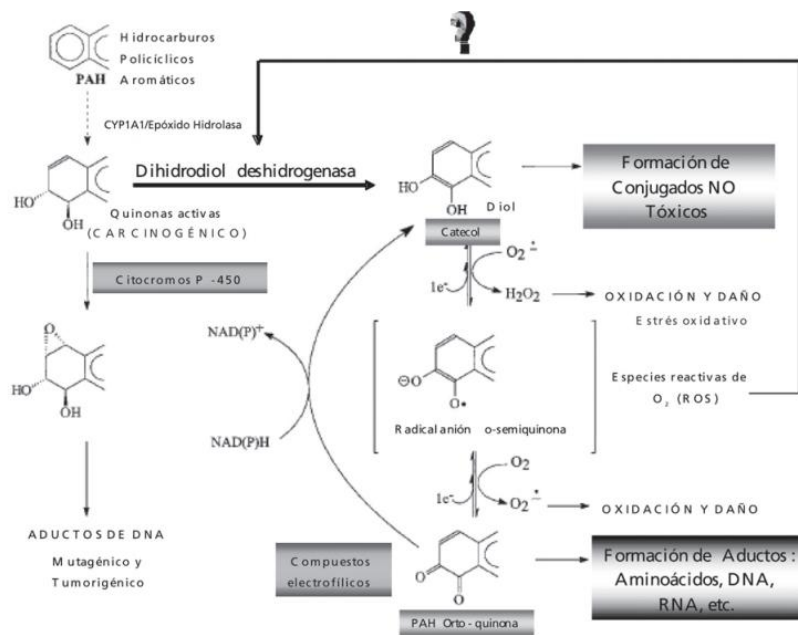


Figura 2. Vía de activación de las dihidrodiol deshidrogenasas (Hernández *et al.*, 2007).

En contraste, los mamíferos emplean el sistema de las enzimas citocromo P450 incorporando un átomo de oxígeno molecular en el HPAs para formar óxidos de areno, también llamados diol epóxidos, que bajo la acción enzimática de una epóxido hidrolasa forman *trans*-dihidrodiol (Rogers y Gibson, 1977). Este sistema no sólo es importante en detoxificación sino también en la bioactivación de los HPAs, ya que se generan potentes carcinógenos (Figura 2).

En cuanto a los hongos, se ha propuesto que algunos de ellos pueden llevar a cabo la degradación de los HPAs de manera similar a las células de mamífero (Sutherland, 1992; Peng *et al.*, 2008; Ghosal, *et al.*, 2016). Cabe destacar que dentro de este grupo se pueden distinguir dos mecanismos involucrados en la degradación de los HPAs (Figura 1):

- I. Degradación mediante enzimas extracelulares del metabolismo de lignina. En hongos ligninolíticos, mediante enzimas como lignina peroxidasas (LiP), manganeso peroxidasas (MnP) y lacasas. Estas enzimas no son específicas y oxidan una amplia variedad de compuestos orgánicos ya que son capaces de degradar HPAs debido a su alta similitud con la estructura de la lignina (Cerniglia, 1997; Peng *et al.*, 2008; Peixoto *et al.*, 2011).
- II. Degradación por el sistema enzimático de citocromos P450. Este sistema cumple la función biológica de detoxificación y esteroideogénesis, la cual está basada en su capacidad de incorporar oxígeno en una amplia variedad de compuestos. Las enzimas tipo citocromo P450 puede oxidar numerosos HPAs a fenoles que pueden ser conjugados con sulfato, ácido glucorónico o glucosa (Cerniglia, 1997; Peng *et al.*, 2008).

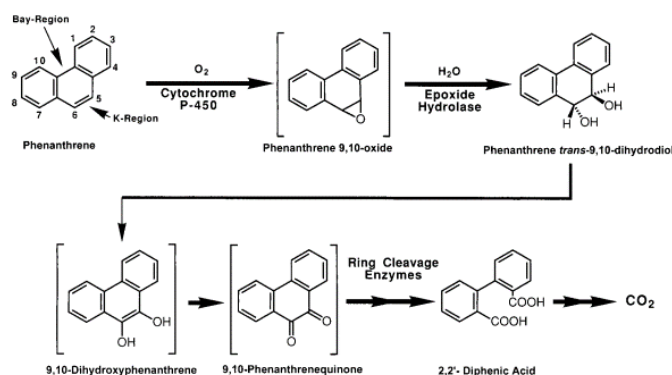


Figura 3. Ruta de degradación intracelular propuesta para fenantreno mediante el sistema enzimático de citocromos P450 (Bezalel *et al.*, 1997).

Aunque algunos autores han propuesto que mediante el sistema P450 no es posible degradar HPAs, Bezalel y colaboradores (1997) propusieron una ruta de degradación de fenantreno mediante este sistema (Figura 3).

En resumen, aunque aún no son muy claros los mecanismos de degradación de HPAs en hongos, se ha establecido que no metabolizan ni mineralizan los HPAs tan rápidamente como las bacterias, pero lo hacen de manera similar a los sistemas enzimáticos de mamíferos; que los hongos no utilizan HPAs como única fuente de carbono y energía, y el medio en que crecen debe ser suplementado con una fuente de carbono que les permita degradarlos; que el metabolismo de hongos para los HPAs es altamente regio- y estéreo-selectivo (Cerniglia y Yang, 1984); que los hongos no ligninolíticos metabolizan HPAs a dihidrodioles, fenoles, quinonas y dihidrodiol epóxidos, y se pueden encontrar productos de conjugación como glucorónidos, xilósidos, glucósidos y sulfatos; que las rutas de conjugación conducen a detoxificación, mientras que los productos de oxidación como quinonas o dihidrodiol epóxidos pueden ser bioactivos y tóxicos (Bezalel *et al.*, 1997); que los hongos producen metabolitos con alta solubilidad en agua y mayor reactividad química, lo que podría aumentar la mineralización de estos compuestos por bacterias nativas del suelo (Das y Chandran, 2011); y que varios sistemas enzimáticos están involucrados en el metabolismo fúngico de HPAs, en los que se incluyen: citocromo p450 y peroxidasa intracelulares, además de lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa extracelulares (Hammel, 1995; Cerniglia, 1997).

### **Dihidrodiol deshidrogenasas**

El estudio de las características de las proteínas permite conocer cómo y en qué procesos biológicos participan y su impacto en las funciones celulares como son la expresión génica, crecimiento celular, nutrición, morfología, comunicación intracelular, entre otros. La comparación de proteínas con la misma función puede mostrar las diferencias en una con respecto a la otra, pudiendo establecer diferencias funcionales como son su pertenencia a diferentes tipos celulares, estadios de desarrollo o estado del organismo en respuesta a cambios ambientales, ya que existen un gran número de proteínas que se expresan únicamente bajo condiciones muy particulares (Golemis, 2002; Twyman, 2014). En este sentido, el estudio de las enzimas involucradas en el proceso de degradación de HPAs permitirá un mejor entendimiento de este proceso y diseñar procesos de degradación más eficiente de estos compuestos.

La primera dihidrodiol deshidrogenasa (DD) descrita se identificó en hígado de conejo (Ayengar *et al.*, 1959). Llamó la atención que esta enzima fuese capaz de oxidar el dihidrodiol de benceno al correspondiente catecol, ya que los dihidrodioles son metabolitos intermediarios altamente carcinogénicos (Carbone *et al.*, 2008). Posteriormente se purificaron otras DD de distintas fuentes incluyendo hígados murinos, cobayo, conejo, mono y humano (Penning *et al.*, 1999).

Las DD son oxidoreductasas NADH ó NADPH dependientes miembros de la super familia de las aldo-ceto reductasas, las cuales típicamente catalizan la reducción de compuestos que contienen grupos carbonilo y/o la reducción de alcoholes (Kelly *et al.*, 2000, Higaki *et al.*, 2002). Se ha reportado, de forma general, que en procariontes estas enzimas utilizan *cis*-dihiodioles como sustrato y requieren  $\text{NAD}^+$  como aceptor de electrones, y en contraste las dihidrodiol deshidrogenasas de eucariontes requieren  $\text{NADP}^+$  como aceptor de electrones y utilizan sustratos *trans* preferentemente (Reiner, 1972; Rogers *et al.*, 1977; Patel y Gibson, 1976; Nagao *et al.*, 1988).

En el caso de algunas DD aisladas de tejidos de monos japoneses, cobayo, perro y conejo, se encontró que estaban formadas por dos subunidades idénticas con pesos moleculares de entre 32 y 36 kDa. Así mismo, en estudios cinéticos, se determinó que la reacción catalizada por las DD diméricas seguía un mecanismo bi-bi ordenado, en el que el  $\text{NADP}^+$  se une primero a la enzima liberando posteriormente NADPH (Carbone *et al.*, 2008); además se observó que la actividad deshidrogenasa es competitivamente inhibida, con respecto a los *trans*-dihiodioles de naftaleno y ciclohexano, por ascorbatos como el L-ascorbato y su epímero el ácido isoascórbico (Carbone *et al.*, 2008).

### **Localización del metabolismo de HPAs**

Se han realizado pocos estudios acerca de la localización de la degradación de compuestos policíclicos en células de mamífero, algunos de estos efectuados con hígado de rata permitieron establecer que en los microsomas se lleva a cabo la activación de los HPAs

para su degradación (Hopkins, 1968; Howes y Hunter, 1968; Vyas *et al.*, 1983; Kumar *et al.*, 1995). Por otro lado, empleando *Pleurotus ostreatus* como modelo de estudio, se encontró que algunas de las actividades enzimáticas relacionadas con las primeras fases de degradación de fenantreno, se encontraban tanto en la fracción citosólica como microsomal. No obstante, las actividades de conjugación posteriores a la activación del fenantreno fueron más altas en la fracción microsomal (Bezalel *et al.*, 1997). A la fecha, no se ha propuesto la existencia de microsomas exclusivos para degradación de HPAs, sin embargo, en estudios más recientes se ha sugerido que la incorporación de los HPAs en el micelio de algunos hongos depende de un transporte activo y se han encontrado dichos compuestos en vesículas internas (Furuno *et al.*, 2012; Fayeulle *et al.*, 2013).

### **Modelo de estudio**

*M. circinelloides* es un hongo dimórfico perteneciente a la familia Mucoraceae, se desarrolla como levadura en condiciones anaeróbicas y como un hongo filamentoso aeróbicamente. Es un hongo de amplia distribución y se puede encontrar en materia en descomposición (Li *et al.*, 2011).

Ha sido de interés en el campo de la biotecnología como fuente de carotenos y lípidos ya que los acumula en altos niveles en el micelio; además de presentar una buena producción de biomasa en biorreactores, es capaz de crecer en una amplia gama de fuentes de carbono; los lípidos de este organismo han recibido especial atención ya que pueden ser fácilmente transformados a biodiesel (Tauk-Tornisielo *et al.*, 2009; Papp *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2017)

## ANTECEDENTES

Es importante el estudio de los mecanismos que median la degradación de HPAs para comprender este proceso. Para este fin se han caracterizado microorganismos aislados de sitios contaminados. Tal es el caso de la cepa YR-1; la cual fue aislada de suelo contaminado con petróleo en las cercanías de la refinería Manuel M. Amor, en la ciudad de Salamanca, Guanajuato, en el año de 1996 y que se planteó como potencial biodegradador de hidrocarburos. Mediante el análisis de los dominios D1/D2 del gen *rRNA 28S* se determinó que la cepa pertenece al género *Mucor* y, realizando cultivos a temperaturas restrictivas para algunas especies del género, se concluyó que el microorganismo aislado es una cepa de *M. circinelloides* (Alvarado, 2007)

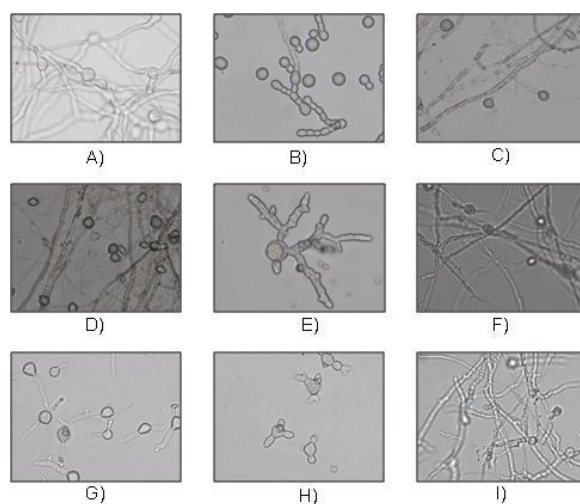


Figura 4. Diferencias morfológicas que presenta la cepa YR-1 cuando crece en presencia de diferentes fuentes de carbono bajo condiciones aerobias A) Glucosa, B) Etanol, C) Glicerol, D) Pentanol, E) Decanol, F) Antraceno, G) Fenantreno, H) Naftaleno, I) Pireno (tomado de Durón, 2012).

En cuanto a la cepa YR-1, la caracterización fisiológica permitió establecer que es capaz de crecer en presencia de una amplia gama de hidrocarburos (Figura 4), tanto alifáticos como aromáticos (Zazueta *et al.*, 2008; Camacho *et al.*, 2014), por lo que en el grupo de trabajo se han estudiado las enzimas involucradas en las primeras etapas de degradación de estos compuestos. En cultivos con decano o hexadecano, se identificó una di-oxigenasa con posible actividad mono-oxigenasa (Zazueta *et al.*, 2003), una enzima tipo citocromo P450 (Vallejo-Tinoco, 2007), además de la actividad alcohol oxidasa, dichas actividades

enzimáticas se hallan relacionadas con la degradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos.

Como parte de la caracterización bioquímica, mediante zimogramas, se identificaron las actividades enzimáticas de dihidrodiol deshidrogenasa cuando el hongo fue cultivado en distintas fuentes de carbono (Figura 5). Se observó la presencia de cinco bandas de actividad cuando el hongo se cultiva con glucosa como fuente de carbono (DD1-5), las cuales son consideradas como dihidrodiol deshidrogenasas constitutivas; y seis actividades enzimáticas inducibles cuando el hongo crece en diferentes fuentes de carbono (iDD1, iDD2, iDD3, NDD, PDD1 y PDD2) (Camacho *et al.*, 2012).

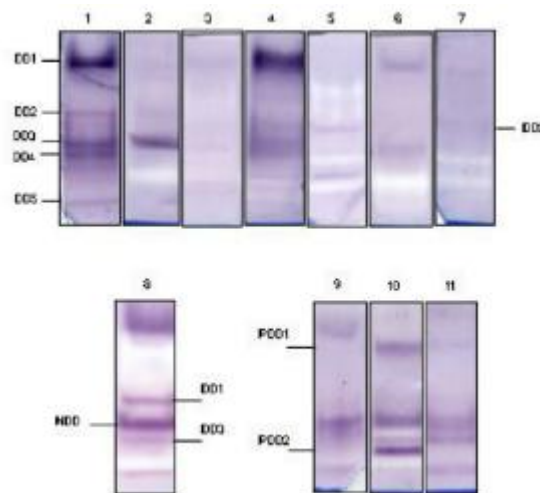


Figura 5. Actividad dihidrodiol deshidrogenasa presente en fracciones citosólicas de *M. circinelloides* YR-1 crecido en distintas fuentes de carbono. Carriles: 1, D-glucosa; 2, glicerol; 3, etanol; 4, n-decanol; 5, n-pentano; 6, n-decano; 7, n-hexadecano; 8, naftaleno; 9, antraceno; 10, fenantreno; 11, pireno. Se usó *cis*-naftalendiol como sustrato y  $\text{NADP}^+$  como aceptor de electrones (tomado de Camacho *et al.*, 2012).

La enzima correspondiente a la actividad *trans*-ndd, inducida en cultivos con naftaleno, fue estudiada como parte del trabajo de tesis de Camacho (2012). Dentro de la caracterización, se determinaron algunas de sus características bioquímicas, encontrando que tiene un peso molecular de 197,400 Da y está formada por cuatro subunidades. Además, mediante gradientes isopícnicos de sacarosa y un enfoque inmunocitoquímico con microscopía electrónica de transmisión, se localizó la enzima NDD en microvesículas (Figuras 6 y 7).

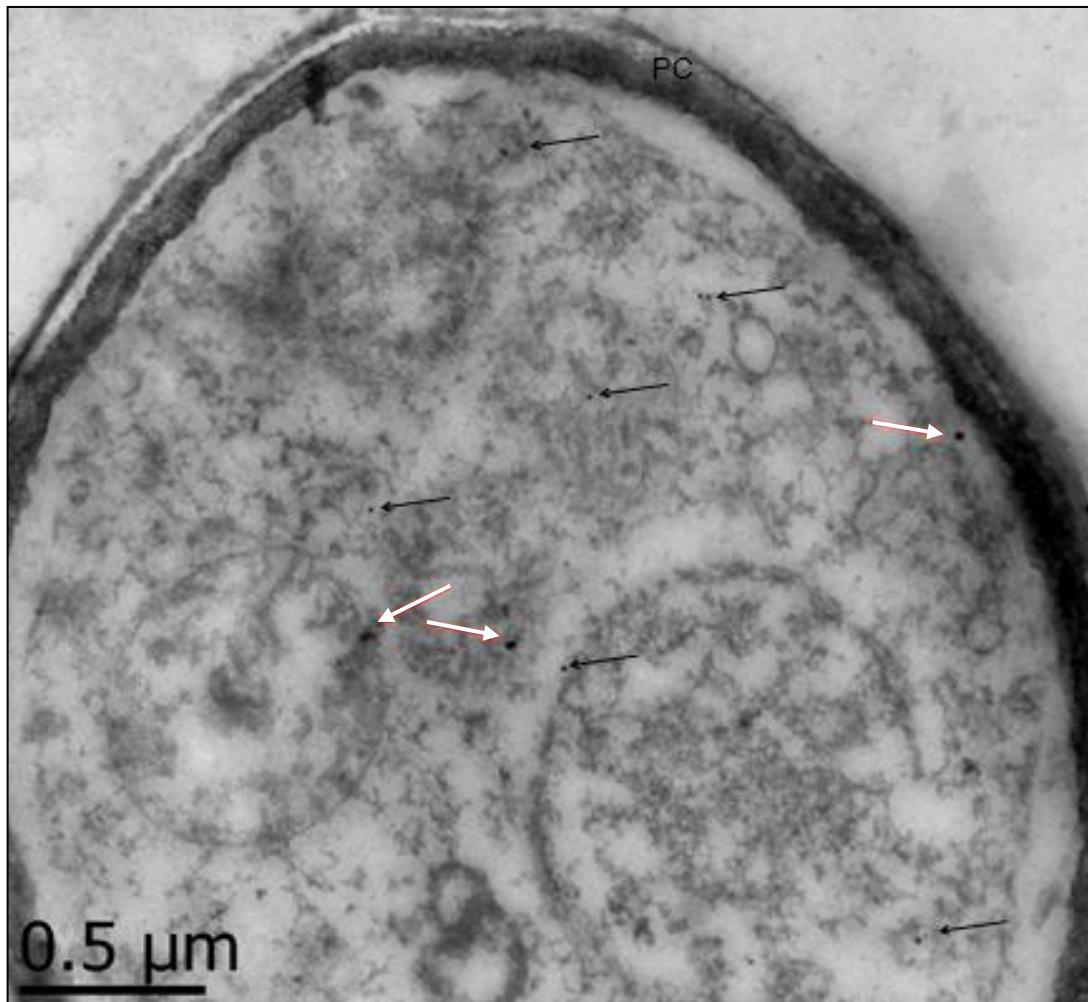


Figura 6. Inmunolocalización de la NDD y peroxidasa en células crecidas en naftaleno. Inmunodetección con anticuerpos anti-NDD y anti-peroxidasa acoplados a partículas de oro de 15 y 25 nm respectivamente. Flechas negras, partículas anti- NDD; flechas blancas, anti-peroxidasa (tomado de Camacho, 2012).

En cuanto a la enzima PDD1, la mayor actividad se observó a las 48 h de incubación en MMSP suplementado con fenantreno (González, 2013). Así mismo, en las tesis de Cortés (2012) y González (2013) se estandarizaron las condiciones de zimogramas para la determinación de actividad *trans*-dihidrodiol deshidrogenasa mediante zimogramas a partir de extractos libres de células crecidas en la presencia de fenantreno. Se establecieron algunos parámetros bioquímicos para estas enzimas como lo son un pH óptimo de 8 para la detección de las actividades PDD1 y 2, así como una temperatura óptima de 37° C para la



detección de ambas actividades. Empleando preparaciones de purificados parciales de la enzima PDD1, se observó que el catión  $\text{Ca}^{2+}$  estimula la actividad *trans*-PDD1 mientras que los cationes  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  la inhiben.

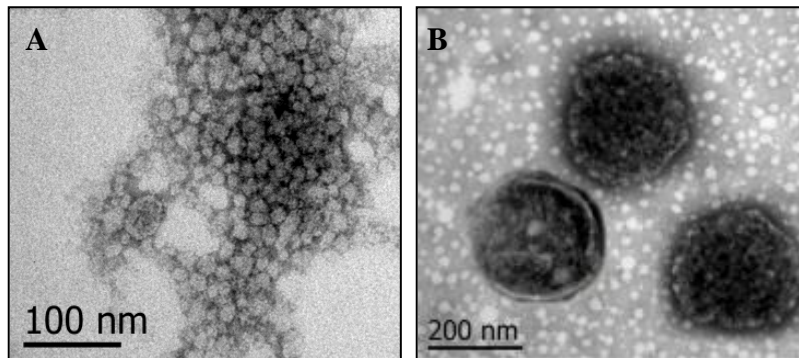


Figura 7. Tinción negativa de muestras de vesículas separadas por un gradiente de sacarosa. A, fracción con actividad *trans*-ndd; B, fracción con actividad peroxidasa (tomado de Camacho, 2012).

## JUSTIFICACIÓN

La cepa YR-1 de *M. circinelloides* es capaz de crecer en presencia de varios HPAs como fuente de carbono y energía, por lo que resulta un excelente modelo para el estudio del catabolismo de tales compuestos, incluyendo la caracterización de enzimas involucradas. Es importante estudiar los procesos de biodegradación de HPAs, especialmente en hongos pues se sabe muy poco acerca de su metabolismo y hay pocos estudios acerca de las actividades DD.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Purificar, caracterizar bioquímicamente y determinar la localización intracelular de la dihidrodiol deshidrogenasa PDD1 inducible por fenantreno en la cepa YR-1 de *M. circinelloides*.

### Objetivos específicos

- Determinar si hay incorporación de HPAs al interior del hongo *M. circinelloides*, cepa YR-1.
- Realizar un estudio bioquímico que incluya la determinación de las constantes de unión a la enzima dihidrodiol deshidrogenasa 1 inducible por fenantreno (PDD1) de la cepa YR-1, tanto del cofactor como del sustrato en conformación *cis* y *trans*.
- Purificar y determinar el peso molecular de la enzima PDD1 de la cepa YR-1 de *M. circinelloides*.
- Determinar la localización subcelular de la actividad atribuible a la enzima PDD1.

## **METODOLOGÍA**

### **Organismo y condiciones de cultivo**

En el presente trabajo, se empleó la cepa de un hongo filamentoso aislada de suelo contaminado con petróleo, denominada YR-1 (Alvarado, 2007). Para el mantenimiento del microorganismo se utilizó el medio YPG a un pH de 4.5 que contiene 0.3% de extracto de levadura, 1% de peptona, 2% de glucosa, suplementado con agar al 2% (Bartnicki y Nickerson, 1962). Este medio fue empleado para la obtención de esporas sembrando en placa e incubando a 28°C durante 3 o 4 días. Una vez observada la formación de micelio y la esporulación, se agregó agua estéril en la superficie del micelio, obteniéndose las esporas en la suspensión acuosa por espatulado. Se realizaron varios lavados por centrifugación con agua estéril, se almacenaron las esporas en tubos cónicos y se contabilizaron utilizando la cámara Neubauer, a partir de diluciones apropiadas de la suspensión.

El medio de cultivo empleado para la propagación del microorganismo fue una variante del medio mínimo de Lee ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.5%,  $\text{MgSO}_4$  0.2%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5%, NaCl 5%), suplementado con peptona al 0.1 % denominado medio mínimo de sales y peptona (MMSP) y como fuente de carbono naftaleno (J. T. Baker Chemical), fenantreno (Sigma–Aldrich), pireno (Sigma–Aldrich) o glucosa (DB Bioxon; Ontario, Canadá), según el caso.

Los cultivos se realizaron en 600 mL de MMSP, inoculando  $5 \times 10^5$  esporas/ml; e incubando a 28°C con agitación constante a 120 rpm, el tiempo de incubación fue de 48 h, excepto en los casos que se indica.

### **Obtención de extracto libre de células**

De cultivos de dos días, se colectaron las células por filtración en papel Whatman No.1 y se resuspendieron en una solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM pH 8.5 conteniendo PMSF 1 mM disuelto en dimetilsulfóxido. Se añadieron perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro y las células se sometieron a rompimiento balístico en un homogenizador Braun

durante 8 periodos de 30 s. Se recuperó el homogenado celular y se sometió a una centrifugación a 12,100 xg por 10 min, seguida de otra a 165,000 xg por 1 h, todo ello a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C para los siguientes ensayos.

### **Microscopía de fluorescencia**

A partir de un cultivo en MMSP con algún HPAs o glucosa como fuente de carbono. Se tomaron las muestras de micelio y se observaron directamente en un microscopio Zeiss Axio Observer Z1 LSM 700, las imágenes fueron obtenidas con el objetivo Achroplan 63x/0.8; a 405 nm de excitación y 435 nm de emisión. En las imágenes de los resultados se especifica la fuente de carbono usada, así como la concentración

### **Zimogramas**

Se realizaron en geles de poliacrilamida en condiciones nativas de acuerdo con Laemmli (1970) con las concentraciones descritas en cada caso, se cargaron extractos libres de células. Para revelar la actividad ndd en los geles se utilizó una modificación del método de zimogramas de actividad de alcohol deshidrogenasa, descrito por Nikolova *et al.* (1991). Se realizó una electroforesis nativa y el gel se sumergió en una solución reveladora que contenía: metasulfato de fenacina, *p*-nitroazul de tetrazolium, NADP, Tris-HCl 50 mM a pH 8.5 y uno de los sustratos, (1R, 2S)-*cis*-1, 2-dihidro-1, 2-naftalendiol o (1R, 2S)-*trans*-1, 2-dihidro-1, 2-naftalendiol. Los electromorfos de actividad se determinaron por medio de la aparición de bandas color violeta, la imagen de los geles se capturó en un escáner de sobremesa Scanner HP ScanJet G2710 Photo Scanner.

### **Tinción de proteínas en gel con azul de Coomassie**

Para observar el patrón de las proteínas presentes en las diferentes fracciones a analizar, los geles provenientes de electroforesis no desnaturizante o desnaturizante se tiñeron con una solución de azul de Coomassie R 0.05% (Bio-Rad). El exceso de colorante se eliminó

por decantación y el gel se destiñó hasta la total desaparición del fondo azul del gel con una solución compuesta por metanol (40%), ácido acético (7%) y agua destilada.

### **Tinción de glicoproteínas (Packer *et al.*, 2002)**

Muestras de extractos libres de células se aplicaron a geles nativos de poliacrilamida al 10%, el corrimiento electroforético se realizó a 100V y 4°C, una vez terminado, se fijó con ácido acético al 7.5% por una hora y se lavó en agua destilada. Posteriormente se sumergió en ácido periódico al 0.2% en frío durante toda la noche, seguido de 6 lavados en agua destilada. Se transfirió una solución fucsina-sulfito 7%, manteniéndolo en oscuridad a 4°C hasta que se observaron bandas de color rosado. Para eliminar el exceso de colorante, se lavó en agua destilada hasta que se aclaró el fondo. Se conservó en ácido acético al 5%.

### **Tinción de proteínas en gel por coloración con plata**

La tinción de geles con plata se realizó usando el Silver Stain Kit (Bio-Rad) de acuerdo con las indicaciones del fabricante como se describe a continuación. Muestras de extracto libre de células fueron sometidas a electroforesis desnaturante en geles al 10%. Terminada la electroforesis, se realizó la fijación de las proteínas en una solución de metanol 40% - ácido acético 10% (v/v) durante un tiempo mínimo de 30 minutos. Se lavó el gel dos veces con una solución de etanol 10% - ácido acético 5% (v/v) durante 30 minutos en cada lavado. Para la fase de oxidación se preparó una solución de oxidizer concentrado silver straind (BioRad) al 10% (v/v) y se sumergió el gel en ella por 10 minutos, seguido de tres lavados de 10 minutos con agua desionizada hasta que el color amarillo dejado por el agente oxidante desapareció. Luego, el gel, se sumergió en una solución al 10% (v/v) de oxidizer concentrado silver straind (BioRad) durante 30 minutos. Se enjuagó durante 2 minutos con agua desionizada y finalmente se reveló con una solución al 3.2% (p/v) de silver stain developer (BioRad) cambiándola cada 5 minutos hasta que se observaron las bandas de proteína. La reacción se finalizó con una solución de ácido acético al 5% (v/v). Todas las soluciones usadas fueron preparadas con agua desionizada.

## Determinación de actividad enzimática por espectrofotometría

Peroxidasa – La actividad de peroxidasa se determinó siguiendo el método de Mahely y Chance (1954), el cual consiste en el uso de 4-aminoantipirina como donador de iones de hidrógeno. La velocidad de reacción es determinada por el incremento de la absorbancia a 510 nm debida a la descomposición de peróxido de hidrógeno. La determinación se realizó a 21 °C en un volumen final de 1 mL que contenía: 0.45 mL de solución de fenol/aminoantipirina (0.0025 M 4-aminoantipirina con 0.17 M fenol, disuelto en agua), 0.5 mL de solución de 0.0017 M peróxido de hidrógeno (diluido en regulador de fosfatos de potasio, 0.2 M, pH 7.0) y 0.05 mL de muestra. Se midió la absorbancia a 510 nm después de 30 minutos de incubación. Una unidad de actividad específica enzimática se definió como la descomposición de un 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por mg de proteína a 21°C en 30 min.

Naftalendiol deshidrogenasa – La actividad de naftalendiol deshidrogenasa (nnd) se determinó mediante una modificación al método de Bergmeyer (1970), en el cual se determinó el incremento de la absorbancia a 340 nm, debida a la reducción del  $\text{NADP}^+$  presente en la mezcla de reacción. El ensayo enzimático se llevó a cabo a 25°C en una mezcla de reacción que contenía: 800  $\mu\text{L}$  de regulador Tris-HCl, 50 mM, pH 8.5, 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{NADP}^+$  38 mM, 50  $\mu\text{L}$  de (1R, 2S)-*cis*-1, 2-dihidro-1, 2-naftalendiol (Fluka) ó (1R, 2S)-*trans*-1, 2-dihidro-1, 2-naftalendiol (Fluka) 19 mM, 50  $\mu\text{L}$  de extracto libre de células y 50  $\mu\text{L}$  de agua. Se incubó la mezcla de reacción durante 30 minutos y, pasado ese tiempo, se midió la cantidad de  $\text{NADP}^+$  reducido. Para los análisis cinéticos, se midió el incremento en la absorbancia a 340 nm durante 4 a 5 min y con el valor de la pendiente ( $\Delta A_{340}/\text{min}$ ) de la parte lineal de la curva se realizó el cálculo de la velocidad de la reacción. Para los ensayos de inhibición por producto final, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de 1,2-dihidroxinaftaleno 6 ó 9 mM disuelto en Tris-HCl 50 mM pH 8.5 a la mezcla de reacción y se determinó la velocidad de la reacción como se describió. La actividad específica de la enzima se expresó como  $\mu\text{moles}$  de  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  formados por minuto por mg de proteína a 21°C.

Oxigenasa – La actividad de oxigenasa se determinó de acuerdo a Zazueta y col. (2003); se realizó a 21°C en un volumen final de 1 mL que contenía: 390  $\mu\text{L}$  de regulador de Tris-HCl

50mM, pH 8.5, 10  $\mu$ L de una solución de naftaleno 19mM disuelto en tris-HCl 25mM como sustrato; 400  $\mu$ L de o-dianisidina al 0.1% diluido en 25 mM HCl y 200  $\mu$ L de extracto libre de células. El producto de la reacción se determinó en un espectrofotómetro Beckman DU-650 a 460 nm. Una unidad de actividad específica enzimática se definió como el consumo de 1 nM de O<sub>2</sub> por mg de proteína en 30 min.

Alcohol deshidrogenasa – La actividad de alcohol deshidrogenasa se llevó a cabo siguiendo el método de Bergmeyer (1970), con el que se determinó el incremento de la absorbancia a 340 nm, debida a la reducción del NAD<sup>+</sup> presente en la mezcla. El ensayo enzimático se llevó a cabo a 21°C en una mezcla de reacción que contenía: 800  $\mu$ L de regulador Tris-HCl, 50 mM, pH 8.5, 50  $\mu$ L de NAD<sup>+</sup> 38mM, 50 $\mu$ L de etanol 15.2 M, 50  $\mu$ L de extracto libre de células y 50  $\mu$ L de agua. La actividad específica de la enzima se expresó como  $\mu$ m de NADH<sup>+</sup> formados por mg de proteína en 30 min.

### **Determinación de proteína total**

La determinación de proteína se llevó a cabo por el método de Lowry (1951), que está basada en la reacción de la proteína con el reactivo de Folin, que provoca una reducción del fosfomolibdato-fosfotungstato del reactivo, por la tirosina y por el triptófano de las proteínas, formando un complejo colorido que absorbe a 750 nm. La concentración se calculó a partir de una curva de calibración realizada con albúmina de suero bovino en concentraciones de 0-100  $\mu$ g.

### **Purificación parcial de la enzima PDD**

Purificación por elución - Se tomaron muestras de extractos libres de células y se sometieron a electroforesis en gel en condiciones nativas, a partir de esos geles se cortaron las bandas donde se localizaba la PDD por comparación directa con una sección teñida del gel (Joo y Speicher, 2007). Para extraer la enzima de interés, las bandas cortadas se colocaron en microtubos de 500 $\mu$ L previamente horadados en la parte inferior y rellenos parcialmente con fibra de vidrio para retener el gel, estos se acoplaron a microtubos de 1.5

mL a manera de colector; el microsistema se sometió a centrifugación a 9,167 x g en una centrífuga Sigma 1-15K durante 10 min; la muestra con la proteína se colectó de la parte inferior del microtubo de 1.5 mL.

Purificación por electroelución - A partir de zimogramas, se cortaron las bandas de interés y se colocaron en una membrana de diálisis con un mínimo de regulador (0.5 – 1 mL) Tris-HCl 50 mM pH 8.5, las membranas de diálisis se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal (Bio-Rad, Mini-Sub Cell GT Cell) y se sometieron a un voltaje constante de 100 V durante 1h, a 4°C. El electroeluido se recuperó y se almacenó a -20°C para ensayos posteriores.

### **Secuenciación por espectrometría de masas MALDI-TOF**

Se obtuvo una muestra mediante purificación por elución, la cual fue sometida a SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% y a partir de dicho gel se cortó la banda de interés, la cual se sometió a análisis en espectrometría de masas MALDI-TOF en la unidad de Proteómica en CINVESTAV unidad Irapuato.

### **Análisis *in silico* de las secuencias proteicas**

Las secuencias correspondientes a las proteínas encontradas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF fueron sometidas a un análisis bioinformático. Se evaluaron cuatro aspectos: glicosilación, unión a cofactores, localización subcelular y dominios trans-membranales.

Glicosilación – cada secuencia se evaluó usando la plataforma GlycoEP (Chauhan *et al.*, 2013), con un método de predicción que busca patrones de glicosilación con al menos un 60% de similitud. Se determinaron los sitios probables de N-, O- y C- glicosilación mediante predicción de patrones y accesibilidad media de la superficie; el porcentaje de sitios de glicosilación se calculó en función del número de sitios de glicosilación predichos respecto al total de aminoácidos en la proteína.



Unión a cofactor – las secuencias se evaluaron en el programa Cofactory v.1.0 (Geertz-Hansen *et al.*, 2014) en el cual cada secuencia identificada como plegamiento Rossmann es asociada con un puntaje en tres redes neurales, una para cada cofactor FAD, NAD o NADP. Un puntaje por encima de 0.5 indica que el dominio predicho es específico para el cofactor. Si no se halla plegamiento de Rossmann el puntaje es indicado como 0. El plegamiento de Rossmann es un motivo estructural que consta de unos 70 aminoácidos y constituye el centro de unión a nucleótidos, la estructura está compuesta por dos motivos  $\beta\alpha\beta$  adyacentes ( $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ ) (Arboledas, 2011).

Localización subcelular – con el programa TargetP 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000) se determinó la posible localización de las proteínas. TargetP 1.1 predice la localización subcelular de proteínas eucariotas, mediante la asignación en base a la presencia de presecuencias en la región N-terminal: péptido de tránsito al cloroplasto, péptido de tránsito a mitocondria o péptido señal de ruta secretora.

Dominios trans-membranales – la búsqueda de dominios transmembranales se realizó con el software TMHMM Server v. 2.0 (Sonnhammer, 1998), el cual modela y predice la ubicación y orientación de las hélices alfa en las proteínas de membrana. Dicho programa está basado en el modelo oculto de Márkov, el cual es un modelo estadístico cuyo objetivo es determinar parámetros desconocidos de una cadena de eventos a partir de parámetros observables (Johnson *et al.*, 2011).

Modelo de la estructura tridimensional – se usó el software en línea Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015) para modelar la estructura secundaria, la predicción de interacción con los ligandos se realizó con 3DLigandSite (Wass *et al.*, 2010).

### **Obtención de anticuerpos anti-PDD**

Para llevar a cabo la producción de anticuerpos se realizaron zimogramas en geles de poliacrilamida, en los que se cargaron 300 $\mu$ g de proteína por carril, a partir de los cuales se

cortó la banda de interés en 5 carriles y se homogeneizó en 1 mL de agua inyectable marca PISA. Con dicho homogenado se inmunizaron, vía intramuscular, 2 conejos machos, de raza neozelandesa, de dos meses de edad. Previo a las inmunizaciones, se colectó suero preinmune. En el caso de la primera inmunización se agregaron a la solución 500  $\mu$ L de adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich) y en las siguientes adyuvante incompleto (Sigma-Aldrich). Se realizó una inmunización cada 15 días, para un total de 5 y, 15 días posteriores a la última, se realizó el sangrado total de los conejos, el sangrado de ambos conejos se manejó como una sola muestra y se le separó el coagulo por centrifugación, se purificó la fracción de inmunoglobulinas G mediante una columna HiTrap rProtein A FF (GE Healthcare). La muestra se diluyó en amortiguador fosfato de sodio 20 mM a pH 7 en una relación 1:3 de muestra: regulador, se centrifugó a 4300 xg y se aplicó a la columna, previamente lavada y equilibrada con amortiguador de unión. Se lavó la columna con amortiguador de unión hasta que la absorbancia a 280 nm en el efluente fue de cero, después se eluyó con citrato de sodio 0.1 M a pH 3, colectando fracciones de 1 mL y midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-650.

### **Ensayos de Inmunodetección**

La transferencia y detección tipo Western es un método para la localización de antígenos inmovilizados sobre una membrana, conjugados directa o indirectamente con anticuerpos acoplados a peroxidasa (Towbin *et al.*, 1979). Las diferentes muestras separadas en geles de poliacrilamida, tanto desnaturizantes como en condiciones nativas, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, previamente equilibradas en regulador de transferencia por 30min, utilizando una cámara de transferencia húmeda (Mighty Small transphor, Hoeffler TE22; Pharmacia Biotech, San Francisco, CA) durante 1 h en frío con un voltaje constante de 100 V. Finalizada la transferencia, se cortó la sección de membrana a la cual se transfirieron los marcadores de peso molecular, en el caso de condiciones desnaturizantes, y el resto de la membrana se bloqueó con leche semidescremada (Svelty) al 0.5% en TBS-Tween al 0.1% pH 7.4, durante 1 h con agitación suave y constante. Posteriormente se incubó con el primer anticuerpo a la dilución indicada para cada caso, durante 1 h o toda la noche para muestras con baja cantidad de proteína a temperatura ambiente, con agitación

suave y constante. La incubación con el segundo anticuerpo policlonal (IgG cabra anti-conejo, Biosource, Camarillo, CA, USA) acoplado a peroxidasa, se realizó en una dilución 1:5000 en regulador TBS (50 mM Tris-Cl, pH 7.6; 150 mM NaCl), se incubó por 1h a temperatura ambiente, en agitación suave y constante. Entre cada aplicación de anticuerpos se realizaron lavados de la membrana con TBS-Tween 20. La detección se reveló mediante la inmersión de la membrana en una solución de 15 mg de 3,3'-diaminobencidina y 170 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.001% en 50 mL de Tris-HCl 50 mM, a pH 7.4, en oscuridad con agitación suave y constante. Una vez observada la coloración café-rojiza de la inmunorreacción, la membrana se lavó con agua destilada.

### **Gradientes isopícnicos de sacarosa**

Los extractos utilizados para determinar la distribución de la enzima en gradientes discontinuos de sacarosa se obtuvieron mediante congelación de las células con nitrógeno líquido y rompimiento en mortero, el homogenado obtenido se resuspendió en una solución de sacarosa al 5% (w/w) conteniendo PMSF 1 mM disuelto en DMSO, como inhibidor de proteasas. La suspensión anterior se aplicó a un gradiente continuo de sacarosa del 10 al 60% (w/w), el cual fue preparado haciendo uso de un formador de gradientes (Hofer<sup>TM</sup> SG30 Gradient Makers, Massachusetts USA), las soluciones iniciales de sacarosa al 10 y 60% fueron calibradas determinando su densidad mediante el índice de refracción. El tubo con la muestra en el gradiente formado se selló con calor y se centrifugó en un rotor VTi 50, a 223,500 x g durante 6 h, a 4 °C. Se obtuvieron fracciones de 1 mL y a cada fracción se le determinó las actividades: peroxidasa y ndd. También se determinó la concentración de proteína y el índice de refracción.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Almacenamiento de HPAs en células completas

Bajo la premisa de que los HPAs son transportados al interior de la célula para su degradación, se realizaron cultivos de la cepa YR-1 en presencia de algunos HPAs a fin de observar si se almacenan dichos compuestos. Aprovechando la propiedad de que los compuestos aromáticos son fluorescentes cuando son expuestos a luz UV (Schwarz and Wasik, 1976), se observó el hongo mediante microscopía de fluorescencia con el fin de localizar los hidrocarburos. Inicialmente se probó con cultivos crecidos en presencia de naftaleno y fenantreno (Figuras 8 y 9); se observó que a concentraciones de 0.3% m/v de fenantreno, había saturación del hidrocarburo, lo que complicaba la observación de la fluorescencia en el hongo; por eso se probaron concentraciones de 0.03 y 0.003% tanto para el fenantreno como para el naftaleno; en ambos casos se observó fluorescencia dentro del micelio y en zonas cercanas a la membrana plasmática, así como algunas estructuras esféricas en donde la intensidad de la fluorescencia era mayor (Figura 8, flecha). En un cultivo de 8 días en fenantreno la fluorescencia se abatió casi por completo, lo que sugiere que en ese tiempo la mayoría del HPA ha sido degradado, lo cual coincide con lo reportado por González (2013) quien a los 10 días encontró una elevada degradación del hidrocarburo.

Como controles se incluyeron el hongo crecido en glucosa como fuente de carbono y el hongo muerto por calor e incubado en MMSP con fenantreno (Figura 8), encontrando fluorescencia en estas muestras, para descartar que la fluorescencia observada en los cultivos de naftaleno y fenantreno no proviene del propio hongo, se tomaron en cuenta todas las condiciones probadas y se cuantificó la intensidad de fluorescencia en cada condición. Posteriormente, se realizó una prueba de normalidad para cada conjunto de datos, ninguno de ellos se ajustó a una distribución normal por lo cual los datos se compararon mediante una prueba de hipótesis usando la prueba U de Mann-Whitney, ya que es una prueba para conjuntos de datos independientes no paramétricos. Para una mejor visualización de la distribución se hizo un gráfico de “caja y bigotes” usando los valores numéricos de fluorescencia (Figura 10). El análisis estadístico se realizó con la

colaboración de la doctora en estadística Boryana López Kolkovska del Warwick Manufacturing Group, University of Warwick Coventry, UK.

Los valores de  $p$  con un valor de significancia  $<0.05$  entre cada conjunto de datos estuvieron en un intervalo de 0 a  $4.17 \times 10^{-34}$  por lo que se establece que los valores de fluorescencia, para cada conjunto de datos, son diferentes entre sí. Ordenándolos en función de los valores de la mediana, la mayor fluorescencia se observó en los cultivos con fenantreno con la concentración máxima de 0.003%. En los cultivos con naftaleno, la fluorescencia no fue mayor a la observada cuando se crece el hongo en glucosa por lo que no se puede asegurar que sea producto del hidrocarburo.

Aunque se observó una mayor fluorescencia en los cultivos con fenantreno, no se logró distinguir el HPAs en vesículas bien definidas como en otros trabajos realizados con *Pythium ultimum* y *Fusarium solani* (Verdin *et al.*, 2005; Furuno *et al.*, 2012; Fayeulle *et al.*, 2014). A diferencia de los datos reportados en esos trabajos, que fueron obtenidos mediante microscopía de excitación de dos fotones (Furuno *et al.*, 2012) o a una longitud de excitación de 345nm (Verdin *et al.*, 2005; Furuno *et al.*, 2012; Fayeulle *et al.*, 2014), las imágenes aquí mostradas se obtuvieron por microscopía de fluorescencia a una longitud de excitación de 405nm. No obstante, los resultados obtenidos sugieren la incorporación de fenantreno al interior celular y la degradación del mismo.

Posteriormente, para observar si empleando un compuesto policíclico con mayor número de anillos se podía obtener una señal más definida de la localización de este dentro de la célula, se realizaron cultivos de la cepa YR-1 en presencia de pireno, el cual es un compuesto formado por cuatro anillos de benceno. La fluorescencia que presentó el pireno fue mucho mayor que la observada con el fenantreno. Y, debido a que el fenantreno tiene una solubilidad 1100 veces mayor al pireno, es frecuente encontrar el fenantreno adsorbido a membranas internas ya que, aunque poca, se ha observado difusión de este último compuesto al interior celular (Fayeulle *et al.*, 2013). Por tal motivo no se incluyeron las observaciones realizadas con pireno en el análisis estadístico.

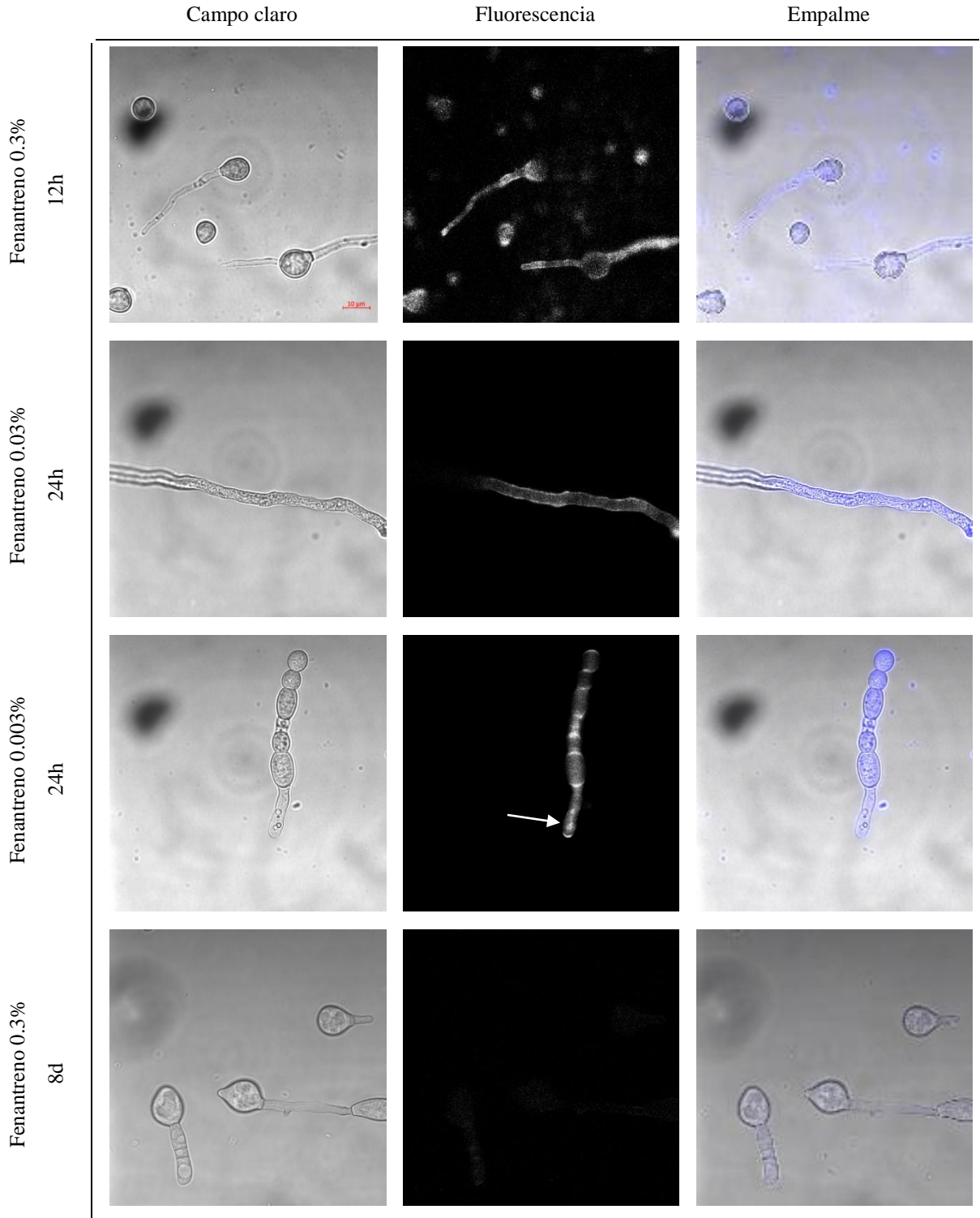


Figura 8. Microscopía de fluorescencia del micelio de la cepa YR-1 cuando se crece en presencia de fenantreno. El hongo fue crecido en MMSP con fenantreno como fuente de carbono: la concentración usada y el tiempo de incubación se indican del lado izquierdo. Las condiciones bajo las que se tomaron las imágenes se describen en Metodología. En la imagen superior izquierda se muestra la barra de escala que se usó para todas las imágenes.

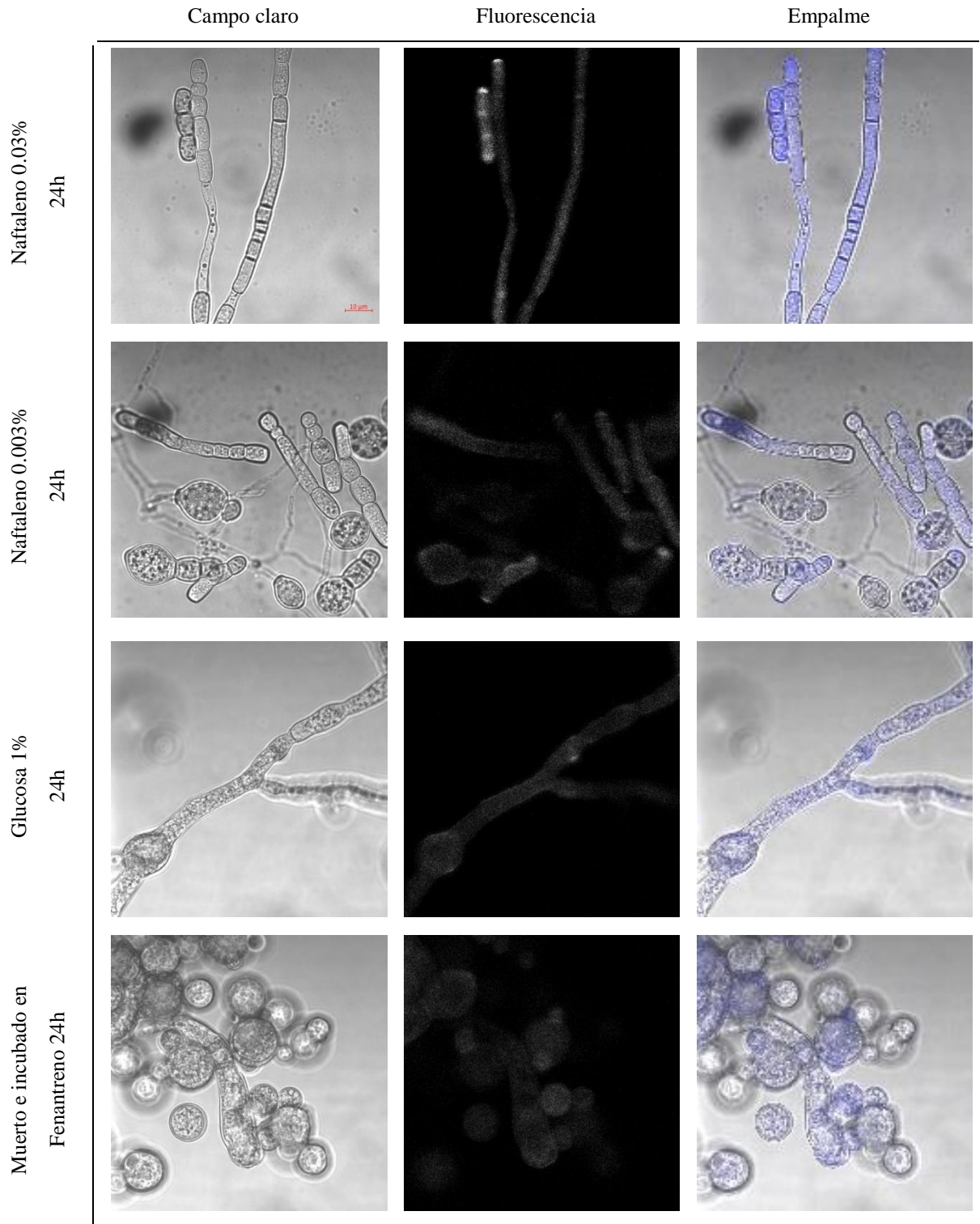


Figura 9. Microscopía de fluorescencia del micelio de la cepa YR-1 cuando se crece en presencia de naftaleno y de los controles. El hongo fue crecido en MMSP y la fuente de carbono que se indica del lado izquierdo, así mismo, se señala la concentración usada y el tiempo de incubación. En la imagen superior izquierda se muestra la barra de escala que se usó para todas las imágenes.

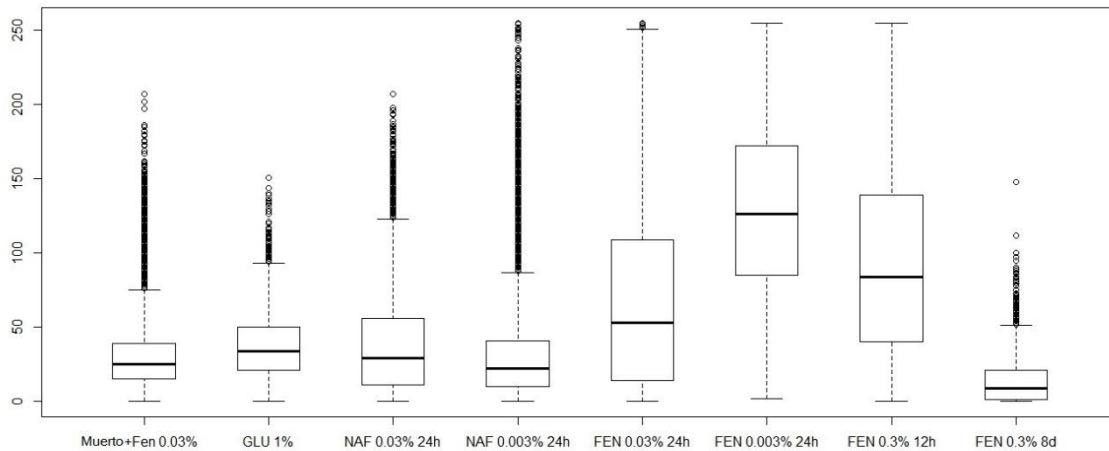


Figura 10. Gráfico de caja y bigotes para representar los valores de fluorescencia de la cepa YR-1 cultivada en distintas condiciones. Para cada conjunto de datos, la línea dentro de la caja y resaltada en negro representa el valor de la mediana. El orden de los conjuntos en función del valor de la mediana es como sigue, la mediana se denota entre paréntesis: FEN 0.003% (126) > FEN 0.3% (84) > FEN 0.03% (53) > GLU 1% (34) > NAF 0.03% (29) > Muerto+Fen (25) > NAF 0.003% (22) > FEN 8 días(9).

Al usar el pireno sí se observó una localización intracelular más precisa de la fluorescencia en comparación con los HPAs de dos y tres anillos, la localización se encontró en cúmulos circulares que podrían ser vesículas almacenadoras de HPAs o acumulaciones de probables vesículas. En la Figura 11 se puede observar la distribución del hidrocarburo; aunque con las tres concentraciones probadas se ve una mayor intensidad en la zona cercana a la pared, a concentraciones de 0.03 y 0.3% se aprecian cúmulos bien definidos en los que se detecta una alta fluorescencia, lo que sugiere la existencia de sitios de almacenaje o procesamiento de HPAs, en la cepa YR-1.

Además de la observación de fluorescencia en células crecidas en presencia de distintos HPAs, se realizaron observaciones de células a distinta profundidad de corte en las que se puede observar que en el interior de la célula es mayor la fluorescencia que cuando las observaciones se realizan en un plano más alejado, y se localiza en sitios delimitados. Lo anterior sugiere que los HPAs se encuentran dentro de la célula y no en la periferia.



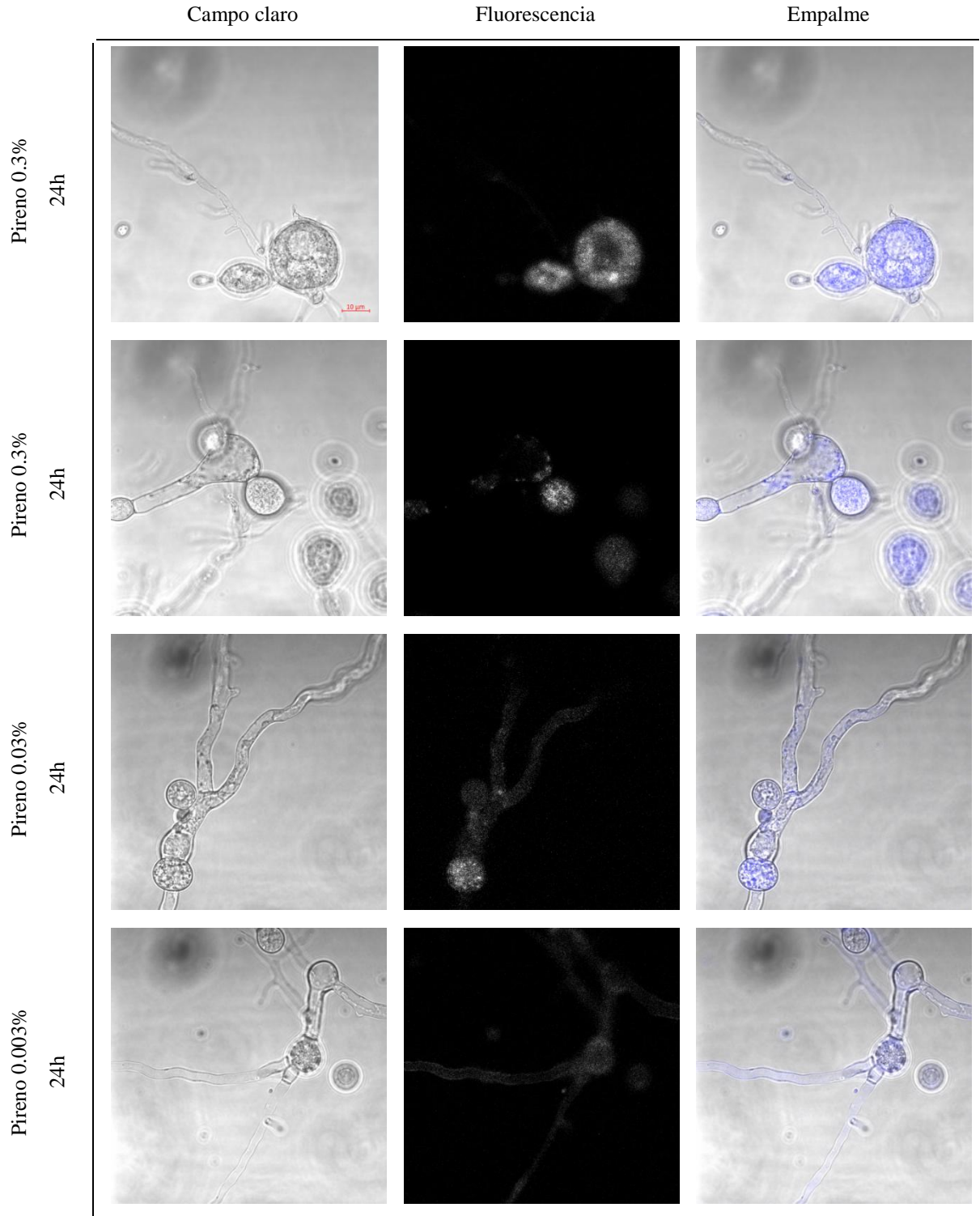


Figura 11. Microscopía de fluorescencia del micelio de la cepa YR-1 cuando se crece en presencia de pireno. El hongo fue crecido en MMSP con pireno como fuente de carbono, la concentración usada y el tiempo de incubación se indican del lado izquierdo. Las condiciones bajo las que se tomaron las imágenes se describen en Metodología. En la imagen superior izquierda se muestra la barra de escala que se usó para todas las imágenes.

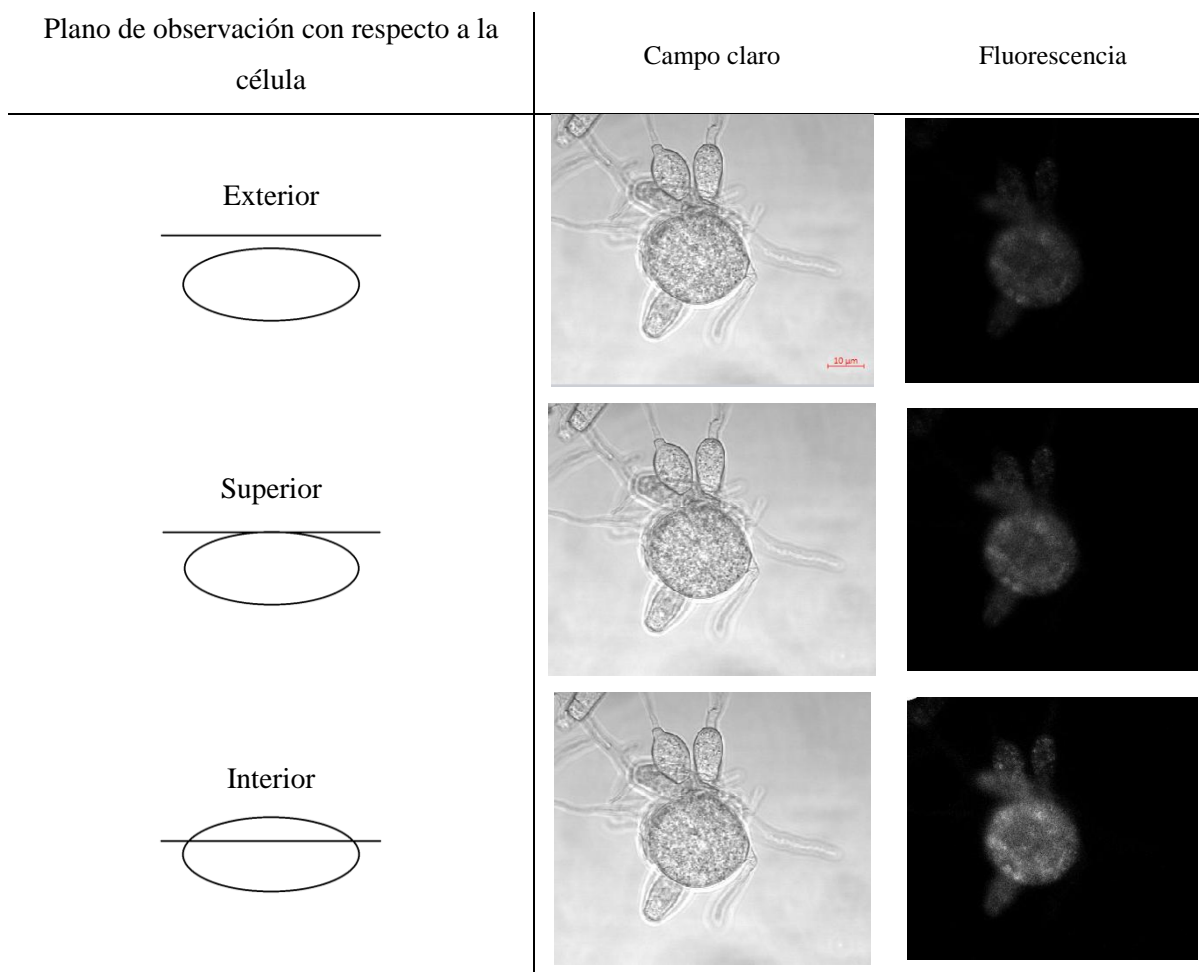


Figura 12. Microscopía de fluorescencia, en tres distintas profundidades, del micelio de la cepa YR-1 cuando se crece en presencia de pireno al 0.3% durante 24h. Las condiciones bajo las que se tomaron las imágenes se describen en Metodología. En la imagen superior central se muestra la barra de escala que se usó para todas las imágenes.

### Caracterización de la actividad *cis*-DD por zimogramas

Para corroborar que la cepa YR-1 de *M. circinelloides* posee una maquinaria enzimática que le permite degradar los HPAs, se continuó con el estudio de la actividad DD. Anteriormente, dentro del grupo de trabajo, se habían realizado estudios preliminares de la enzima PDD1 para establecer las condiciones óptimas para medir la actividad de la misma, tanto en zimogramas como por ensayos espectrofotométricos (Cortés, 2012; González, 2013). Sin embargo, todos estos análisis se realizaron empleando (1R,2S)-*trans*-1,2-dihidro-1,2-naftalendiol como sustrato para la enzima y no se contaban con datos acerca del

sustrato (1R,2S)-*cis*-1,2-dihidro-1,2-naftalendiol; por esto los primeros experimentos de este trabajo estuvieron enfocados en estandarizar la detección de la actividad enzimática con dicho sustrato. La primera aproximación fue el uso de zimogramas, ya que es una herramienta sencilla que permite obtener una gran cantidad de información de las enzimas presentes en una muestra, sin la necesidad de purificar a homogeneidad (Camacho *et al.*, 2012). Es importante señalar que, aunque las actividades son medidas con dioles de naftaleno, las enzimas son inducidas con fuentes de carbono que pueden ser distintas al naftaleno.

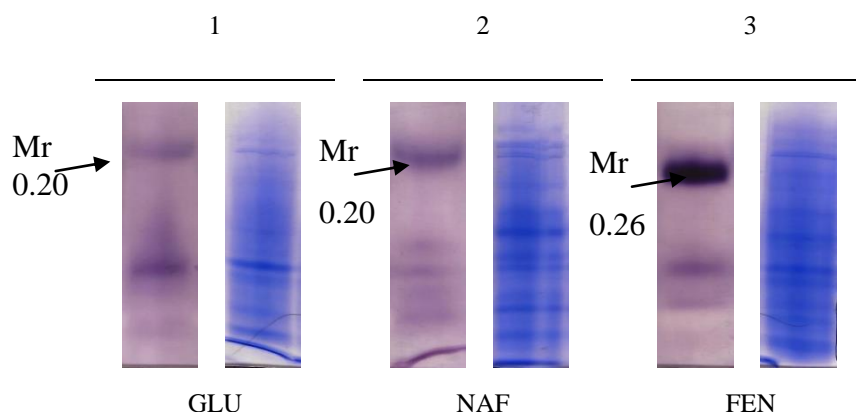


Figura 13. Enzimas con actividad *cis*-nnd inducidas por la presencia de tres distintas fuentes de carbono. Electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6%, con 300  $\mu$ g de proteína en cada carril. Los extractos libres de células se obtuvieron de cultivos de 48h en MMSP con las fuentes de carbono que se indican: 1-glucosa, 2-fenantreno, 3-naftaleno. Se señala con una flecha la actividad correspondiente a la enzima PDD1. En cada caso se muestra el zimograma y el patrón de bandeos con azul de coomassie.

Camacho *et al.* (2012) reportaron que la actividad de la enzima PDD1 solo se observa cuando la cepa YR-1 es crecida en fenantreno como fuente carbono; sin embargo, no se abordó si al usar el sustrato *cis* podía identificarse la actividad; por esto, se realizó un zimograma empleando extractos libres de células provenientes de cultivos crecidos en glucosa al 1%, fenantreno o naftaleno al 0.3%, de modo que pudiese corroborarse la actividad diferencial de la enzima y si era capaz de utilizar el sustrato mencionado. En la Figura 13 se observa en el extracto proveniente de células crecidas con fenantreno como fuente de carbono, un electromorfo de actividad correspondiente con la enzima PDD1, que presenta un corrimiento electroforético distinto de las DD presentes en los extractos de glucosa y naftaleno, lo cual corrobora la inducción de la enzima por el fenantreno.

Para comparar la actividad de la enzima con ambos sustratos, se reveló en zimograma, la actividad PDD1 empleando tanto el sustrato *cis* como el *trans*-naftalendiol. En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos para este análisis, así como los controles empleados y el perfil de proteínas teñido con azul de Coomassie. Con el extracto desnaturalizado (carriles 1 y 3) no se observó actividad, al igual que en donde no se añadió ninguno de los dos sustratos, pero sí el cofactor (carril 5).

En los carriles 2 y 4 revelados con el sustrato *trans* y *cis*, respectivamente, se observan tres electromorfos de actividad en ambos casos. Sin embargo, es notorio que cuando se emplea el sustrato *cis*, la banda de actividad correspondiente a la enzima PDD1 es más intensa que con el sustrato *trans*, lo cual es indicativo de una mayor actividad.

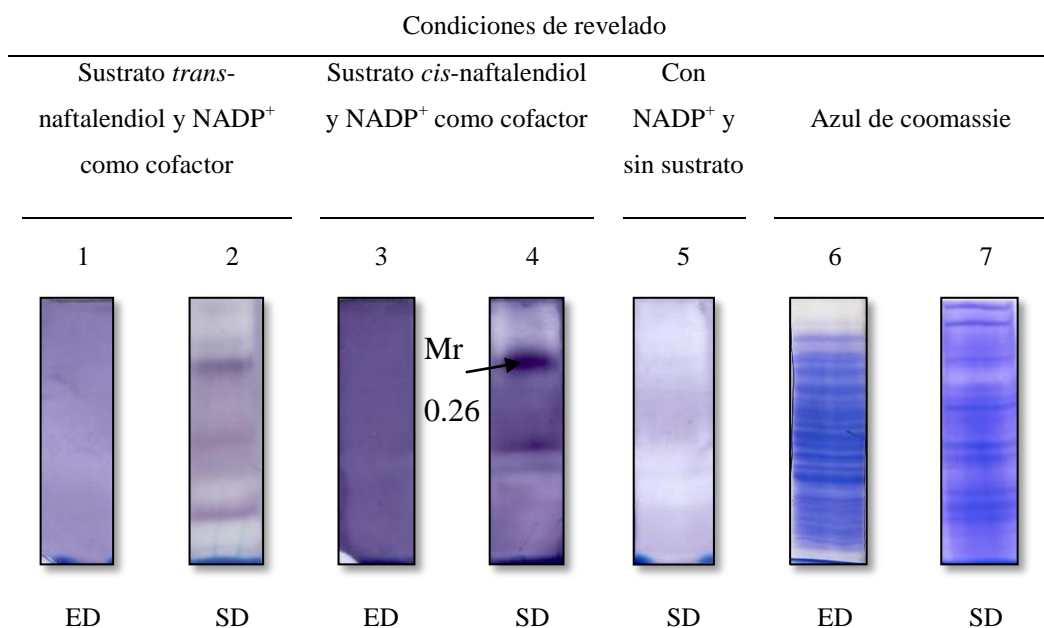


Figura 14. Zimograma de las actividades *cis*- y *trans*- ndd de las enzimas PDD presentes en extractos libres de células de la cepa YR-1 crecida en MMSP con fenantreno al 0.3% como fuente de carbono. Se realizó el análisis en un gel de poliacrilamida al 6%, se colocaron 300 µg de proteína en los carriles para evaluar la actividad enzimática por zimogramas y 200 µg en el teñido con coomassie. Para los controles negativos el extracto se sometió a ebullición durante 10 min para desnaturalizar las proteínas; ED – extracto desnaturalizado, SD – sin desnaturalizar.

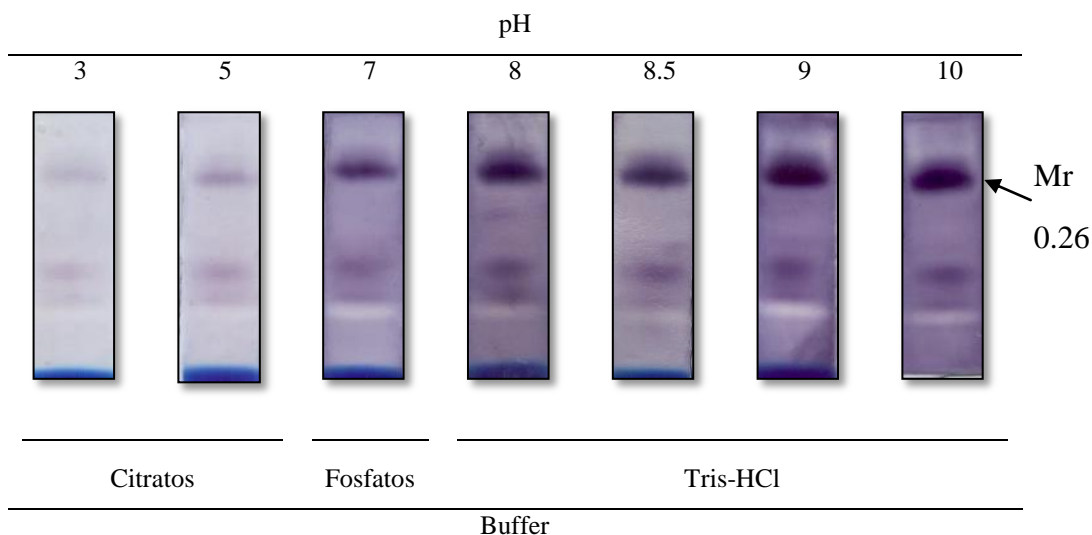


Figura 15. Efecto del pH sobre la detección de la actividad *cis*- ndd de las enzimas PDD presentes en extractos libres de células de la cepa YR-1 crecida en MMSP con fenantreno al 0.3% como fuente de carbono. Se realizó el análisis en un gel de poliacrilamida al 6% y se colocaron 300  $\mu$ g de proteína en cada carril.

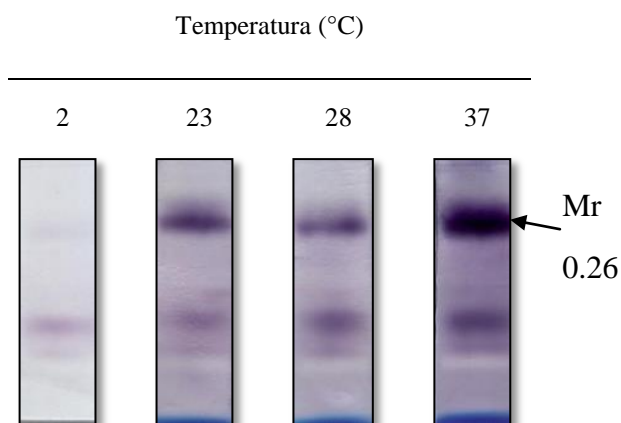


Figura 16. Efecto de la temperatura sobre la detección de la actividad *cis*- ndd de las PDD presentes en extractos libres de células de la cepa YR-1 crecida en MMSP con fenantreno al 0.3% como fuente de carbono. Se realizó el análisis en un gel de poliacrilamida al 6% y se colocaron 300  $\mu$ g de proteína en cada carril.

También se realizó la determinación del efecto del pH y temperatura sobre la actividad de las PDD cuando se emplea el sustrato *cis*. De manera cualitativa, se observó una mejor detección de la actividad a pH alcalino (Figura 15) y a 37°C (Figura 16), tanto para la PDD1 como para las otras dos deshidrogenasas detectadas en los ensayos. Estos resultados

coinciden con lo observado por Cortés (2012) y González (2013) que encontraron una mayor actividad de la enzima PDD1 a una temperatura de 37°C y a pH por encima de 8.0 cuando se usa el sustrato *trans*.

### Determinación del punto isoeléctrico

Empleando geles comerciales (Bio-Rad) se calculó el pI de la enzima (Figura 17). A partir de purificados parciales de la enzima PDD1 obtenidos mediante elución por centrifugación, se determinó un valor de pI de 8.0 para la enzima. Anteriormente, en el análisis *in silico* realizado por Cortés (2012) se estimaron valores de 5.61 y 6.02 para dos posibles secuencias génicas candidatas de la enzima PDD1, identificadas como *jgi|Mucci2|148979|e\_gw1.08.809.1* y *jgi|Mucci2|83367|Mucci1.fgenesMC\_pg.6\_#\_309*. Sin embargo, el valor experimental obtenido no coincide con ninguno de los dos valores teóricos reportados; esto podría deberse a que existen modificaciones postraduccionales en la enzima que modifican dicha característica o a que la actividad PDD1 no corresponde con las secuencias halladas en el análisis *in silico*.

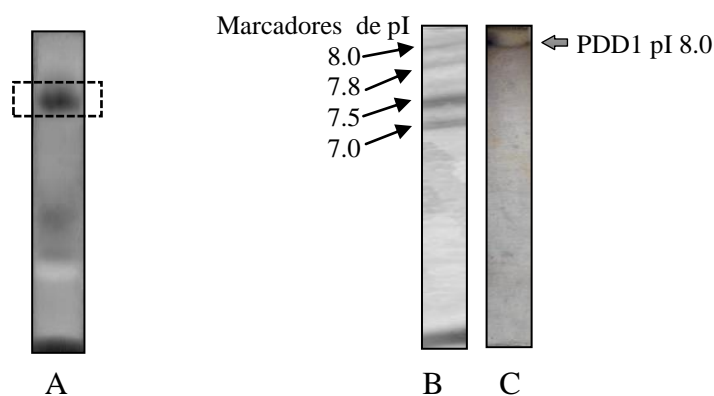


Figura 17. Determinación de punto isoeléctrico de la enzima PDD1. Se empleó un gel preformado Ready Gel® IEF con capacidad de resolución de pH de 3 a 10. Carril A, banda cortada para eluir la muestra sometida a isoelectroenfoque. Carril B, marcadores de pI con sus respectivos valores. Carril C enzima PDD1 obtenida por elución. Se usaron marcadores preteñidos y la banda de la enzima PDD1 fue teñida con plata.

## Determinación de glicosilación de la enzima PDD1

Parte importante del estudio de una enzima es conocer las modificaciones postraduccionales a las que está sujeta, ya que algunas de ellas tienen un papel fundamental en la regulación de la actividad, localización e interacción con otras moléculas. Como un primer enfoque, se analizó la glicosilación de las proteínas presentes en extractos libres de células cultivadas en fenantreno. Una particularidad de las proteínas altamente glicosiladas es que no se tiñen con azul de Coomassie (Osset, 1989; Fernández y Martínez, 2000) lo cual puede observarse en los controles positivo y negativo (Figura 18 carriles 4 a 7), en donde la peroxidasa altamente glicosilada se tiñó con el ácido peryódico de Schiff pero no con Coomassie, mientras que para la hemoglobina, que no está glicosilada, se observa lo contrario. La banda correspondiente a la enzima PDD1 se tiñe con ambas técnicas (Figura 18, carriles 2 y 3) sugiriendo que se encuentra glicosilada, aunque en menor cantidad que la peroxidasa. Sin embargo, ya que no se tiene la certeza de una proteína única en la banda de actividad, podrían encontrarse otras proteínas que influyen en la tinción, ya sea uniendo el Coomassie o la base de Schiff.

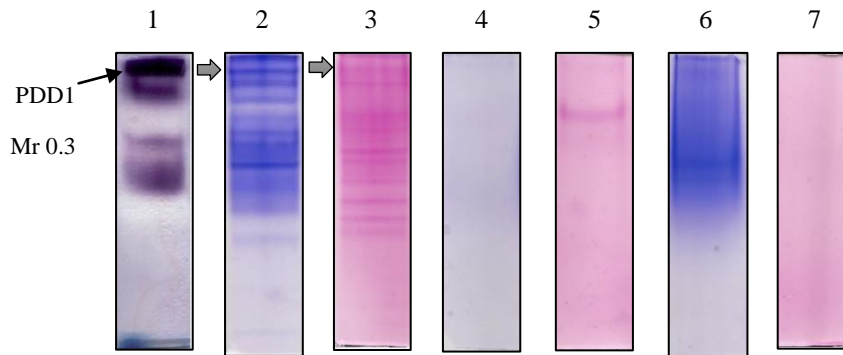


Figura 18. Proteínas glicosiladas presentes en el extracto libre de células cultivadas en fenantreno. El análisis electroforético se realizó en un gel de poliacrilamida al 10%. Carriles 1 a 3, extracto libre de células crecidas en fenantreno como fuente de carbono; 1, zimograma de detección de actividad enzimática *cis* – *ndd*; 2, patrón de la tinción con azul de coomassie; 3, tinción de glicoproteínas. Carriles 4 y 5, peroxidasa como control positivo de la tinción; 4 patrón de tinción con azul de coomassie; 5, tinción de glicoproteínas con ácido periódico-Schiff. Carriles 6 y 7, hemoglobina como control negativo de la tinción de glicoproteínas; 6, patrón de bandeado teñido con coomassie; 7, tinción de glicoproteínas. Las glicoproteínas fueron teñidas por el método del ácido periódico – Schiff.

También puede observarse que hay más proteínas glicosiladas presentes en el extracto libre de células, y aparentemente la enzima PDD2 es una de ellas, aunque en el zimograma (Figura 18, carril 1) no es muy clara la posición de ésta.

### **Purificación parcial de la actividad PDD1 y cálculo de constantes de unión de sustrato y cofactor por la enzima PDD1**

Un aspecto importante en el estudio de las reacciones químicas que ocurren en las células es conocer las interacciones que ocurren entre las moléculas, en este sentido, para estudiar cómo la enzima PDD1 interactúa con los sustratos es posible plantear la reacción que se lleva a cabo de la siguiente manera:



En esta reacción se tienen dos sustratos que son transformados en dos productos.. Sin embargo, se ha definido un cofactor como una molécula no proteica necesaria para que se lleve a cabo la catálisis, la cual puede actuar tanto como acarreador como co-sustrato (Hashim y Adnan, 1994), lo cual se ajusta al comportamiento del NADP<sup>+</sup> en la reacción, por lo que, en adelante hará referencia al NADP<sup>+</sup> como cofactor.

Este tipo de reacción ha sido reportado en general para todas las aldo-ceto reductasas (Penning, 2015); además, varias enzimas de este grupo son capaces de emplear distintos sustratos, por lo que se realizó la determinación de las constantes de unión de los sustratos *cis* y *trans* a la enzima PDD1.

Para el estudio de la unión de las moléculas partícipes en una reacción existen varios métodos (Tabla 3), los de investigación de equilibrio múltiple pueden dar información acerca de la unión del complejo enzima-sustrato; sin embargo, en el estudio de cinética enzimática la reacción debe monitorearse con métodos que permitan su seguimiento a lo largo de un periodo de tiempo, como los son los métodos electroquímicos, calorimétricos y espectroscópicos (Bisswanger, 2008). En este trabajo se usó un método basado en el espectro de absorción del NADP, ya que para realizar estudios de cinética enzimática es necesario contar con el monitoreo constante de la velocidad con que ocurre la reacción



(Bisswanger, 2008) y dicho método mide la reducción de NADP debida a la catálisis realizada por la enzima, lo que permite monitorear al tiempo que ocurre la reacción, el proceso catalítico.

Métodos para investigación de Equilibrio Múltiple	Métodos electroquímicos	Métodos calorimétricos	Métodos espectroscópicos
Diálisis de equilibrio Ultrafiltración Filtración en gel Ultracentrifugación Resonancia de plasmones de superficie	Electrodo de oxígeno Electrodo de CO <sub>2</sub> Potencial redox Polarografía	Calorimetría	Espectro de absorción Bioluminiscencia Fluorescencia Dicroísmo circular y dispersión óptica rotatoria IR y Raman Resonancia paramagnética electrónica

Tabla 3. Técnicas de para el estudio de equilibrio múltiple y cinética enzimática (Bisswanger, 2008).

Usando un purificado parcial obtenido mediante elución por centrifugación a partir de un gel de poliacrilamida, se realizó la medición de actividad nnd como se describe en la sección de metodología. La pureza de la enzima se corroboró mediante SDS-PAGE teñido por plata (Figura 19); se observó la presencia de una única banda de 57 kDa, lo cual sugería que había una proteína única en el purificado; sin embargo, no se realizaron más experimentos para corroborarlo.

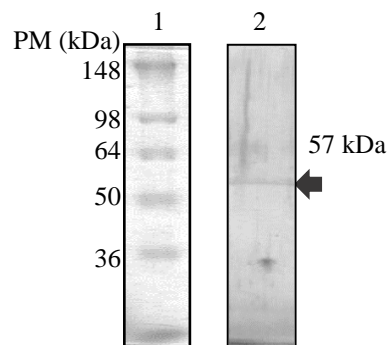


Figura 19. SDS-PAGE de la enzima PDD1 purificada a partir de geles al 6% sin teñir. El gel se elaboró a una concentración de 10% de acrilamida. Carril 1, marcadores de peso molecular, el peso de cada uno de ellos se señala del lado izquierdo; se emplearon marcadores pre-teñidos. Carril 2, Banda teñida con plata, del lado derecho se señala el peso molecular calculado.

Sustrato	$K_m$	$V_{max}$	$R^2$ promedio
(1R,2S)- <i>cis</i> - 1,2-dihidro-1,2 naftalendiol 0 – 25 mM	14.88	5.42	0.94
(1R,2S)- <i>trans</i> - 1,2-dihidro-1,2 naftalendiol 0 – 21 mM	5.42	5.77	0.97

Tabla 4. Valores calculados para las constantes de unión de los sustratos *cis* y *trans*.  $K_m$  (mM);  $V_{max}$  (mmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> de proteína).

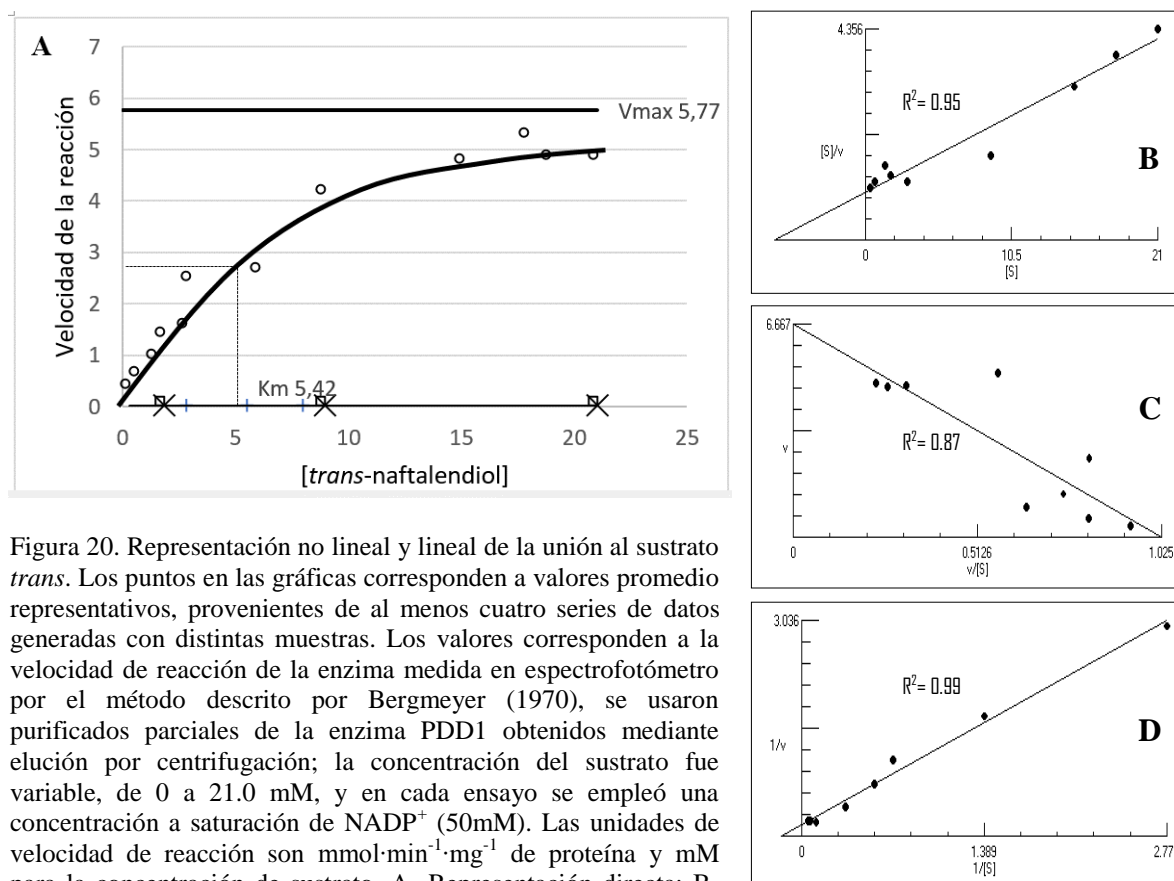


Figura 20. Representación no lineal y lineal de la unión al sustrato *trans*. Los puntos en las gráficas corresponden a valores promedio representativos, provenientes de al menos cuatro series de datos generadas con distintas muestras. Los valores corresponden a la velocidad de reacción de la enzima medida en espectrofotómetro por el método descrito por Bergmeyer (1970), se usaron purificados parciales de la enzima PDD1 obtenidos mediante elución por centrifugación; la concentración del sustrato fue variable, de 0 a 21.0 mM, y en cada ensayo se empleó una concentración a saturación de NADP<sup>+</sup> (50mM). Las unidades de velocidad de reacción son mmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> de proteína y mM para la concentración de sustrato. A- Representación directa; B- Modelo de Hanes; C- Modelo de Eadie Hofstee; D- Modelo Lineweaver-burk. En la gráfica A: ○ [NADP] constante y [trans-naftalendiol] variable, × Sin NADP, □ Sin trans-naftalendiol.

Para ambos sustratos, al graficar los valores de velocidad de reacción contra los valores de concentración de sustrato, se observó que describían una función hiperbólica, es decir se ajustan al modelo Michaelis-Menten. En la Figura 20 se ejemplifica el análisis realizado para

el cálculo de las constantes de unión al sustrato *trans*; y, aunque solo se muestra la representación no lineal (Figura 21), se siguió el mismo procedimiento para los datos de actividad con el sustrato *cis*. En la Tabla 4, se observa que se lleva a cabo la oxidación de ambos sustratos con una velocidad similar. Lo anterior contradice lo reportado en la literatura ya que se ha establecido que las DD eucariotas únicamente pueden catalizar la conversión de dioles *trans* (Reiner, 1972; Rogers et al., 1977; Patel y Gibson, 1976; Nagao et al., 1988; Cerniglia, 1997) y en estos resultados se determinó que hay actividad ndd con ambos sustratos, aunque a diferencia de lo que sugerían los zimogramas, aparentemente con mayor afinidad por el sustrato *trans*.

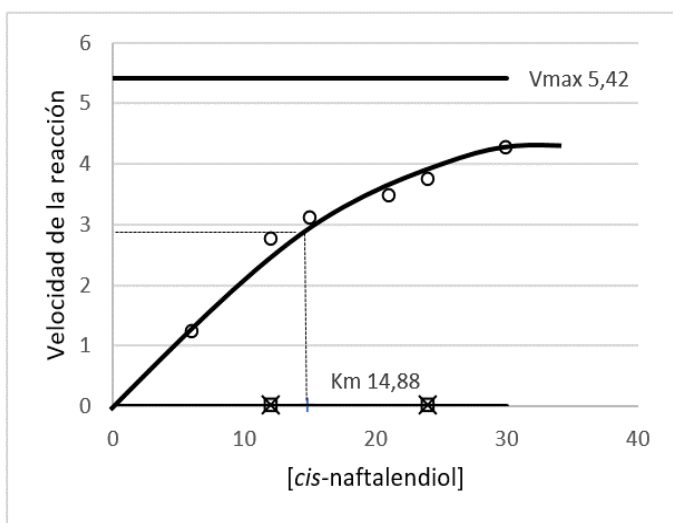


Figura 21. Representación no lineal de la unión al sustrato *cis*-naftalendiol. Los puntos corresponden a valores promedio representativos, de al menos cuatro series de datos generadas con distintas muestras. Los valores corresponden a la velocidad de reacción de la enzima medida en espectrofotómetro por el método descrito por Bergmeyer (1970), se usaron purificados parciales de la enzima PDD1 obtenidos mediante elución por centrifugación; la concentración del sustrato fue variable, de 0 a 30 mM, y en cada ensayo se empleó una concentración a saturación de NADP<sup>+</sup> (50mM). Las unidades de velocidad de reacción son mmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> de proteína y mM para la concentración de sustrato. ○ [NADP<sup>+</sup>] constante y [trans-naftalendiol] variable, × Sin NADP, □ Sin trans-naftalendiol.

### Constantes de unión de la enzima PDD1 a su cofactor NADP<sup>+</sup>

Continuando con el estudio cinético, se calcularon las constantes de unión del cofactor a la enzima, obteniendo así valores de unión para el NADP<sup>+</sup> cuando se usa el sustrato *cis* ó el *trans*. Al igual que para el cálculo de las constantes de unión del sustrato, se usaron muestras de la enzima, purificada mediante elución por centrifugación para realizar la medición de actividad ndd. Tanto con el uso de sustrato *cis* como *trans*, al graficar los valores de velocidad de la reacción, se observó una gráfica logarítmica (Figuras 22 y 23A) lo que indica un efecto cooperativo en el sistema, esto implica que la unión de una molécula de NADP<sup>+</sup> aumenta la velocidad con que se unen las siguientes moléculas de

mismo cofactor a la enzima (Bisswanger, 2008). En este tipo de cinética no es posible obtener las constantes de unión mediante modelos lineales, para estos casos se emplean modelos como el descrito por la ecuación de Hill (1910) mediante el cual es posible obtener una constante de cooperatividad que permite obtener información acerca de la estructura y función de la enzima, y dado que la afinidad de la enzima por el sustrato cambia con relación al grado de saturación de la misma, la  $K_m$  obtenida se denomina como  $K$  aparente o  $K_{app}$  (Bisswanger, 2008).

Para el cálculo de las constantes para el  $\text{NADP}^+$ , se empleó el software GraphPad Prism; sin embargo, el valor generado por dicho programa para la  $V_{max}$  se encontraba por debajo de la velocidad máxima observada. Para tener una mejor estimación de la constante, se realizó una transformación de los datos, de una función logarítmica a una hiperbólica y se procedió a realizar el cálculo de la  $K_{app}$  y  $V_{max}$  mediante los modelos lineales.

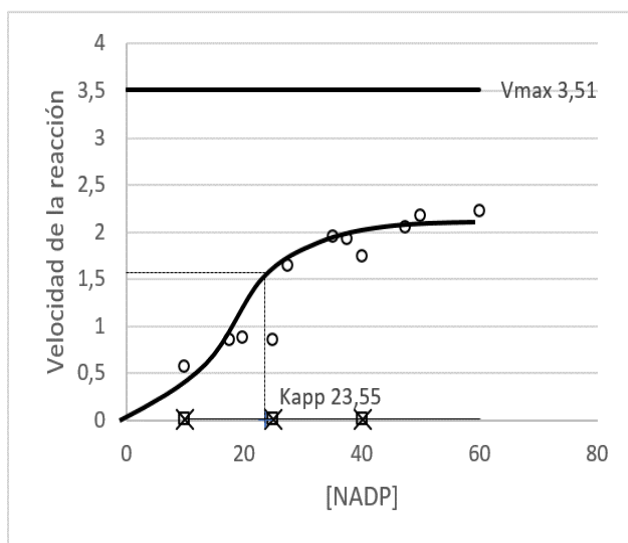


Figura 22. Representación de los datos de unión al  $\text{NADP}^+$  cuando se emplea sustrato *trans*. Los puntos de las gráficas corresponden a valores promedio representativos, provenientes de al menos cuatro series de datos generadas con distintas muestras, cada uno corresponde a la velocidad de reacción experimental promedio de la enzima medida espectrofotométricamente por el método descrito por Bergmeyer (1970), se usaron purificados parciales de la enzima PDD1 obtenidos mediante elución por centrifugación; la concentración  $\text{NADP}^+$  fue de 0 a 60.0 mM, en cada ensayo se empleó una concentración de sustrato *trans* 19 mM. Las unidades de velocidad de reacción son  $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína y mM para la concentración de sustrato. ○ [NADP] variable y [*trans*-naftalendiol] variable, × Sin NADP, □ Sin *trans*-naftalendiol.

Se observa que los valores de las constantes son muy distintos según el sustrato empleado (Tabla 5), y que cuando la enzima emplea el sustrato *cis* muestra una mayor afinidad por el cofactor, además de alcanzar una velocidad de reacción mayor que cuando cataliza la conversión del sustrato *trans*; esto no es contradictorio respecto a los resultados de la Tabla 4, ya que los valores mostrados anteriormente representan la afinidad de la enzima por los sustratos, mientras que los de la Tabla 5 son referentes al cofactor.

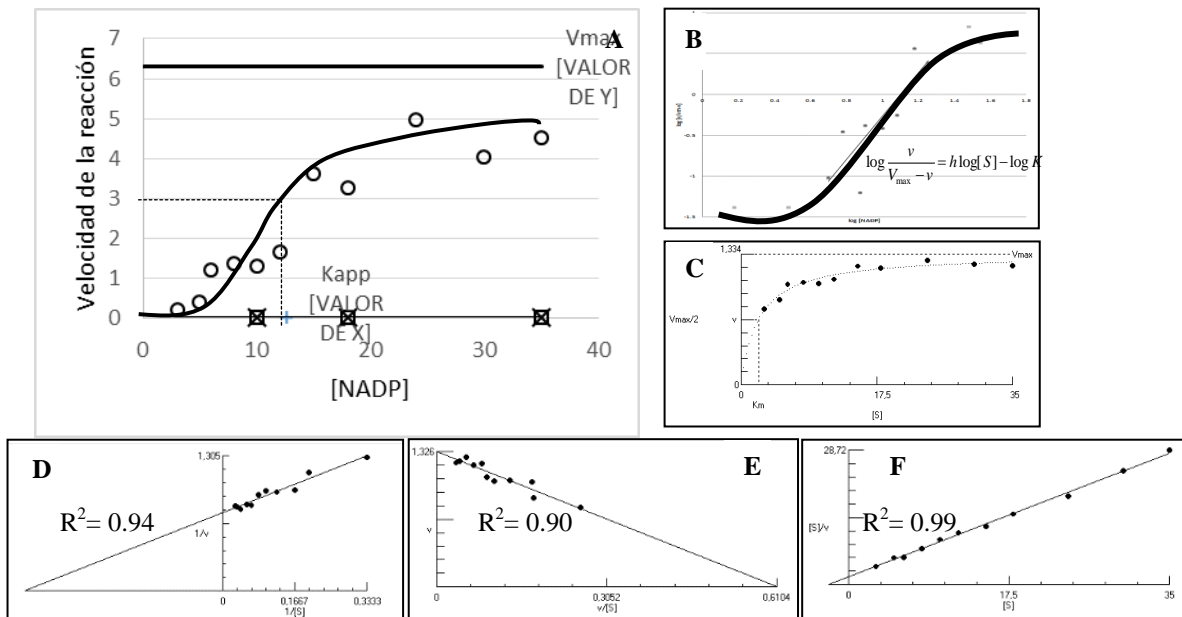


Figura 23. Representación de los datos de unión al NADP<sup>+</sup> cuando se emplea sustrato *cis*. Los puntos de las gráficas corresponden a valores promedio representativos, provenientes de al menos cuatro series de datos generadas con distintas muestras, cada uno corresponde a la velocidad de reacción experimental promedio de la enzima medida espectrofotométricamente por el método descrito por Bergmeyer (1970), se usaron purificados parciales de la enzima PDD1 obtenidos mediante elución por centrifugación; la concentración NADP<sup>+</sup> fue de 0 a 60.0 mM aunque solo se muestra hasta 40, en cada ensayo se empleó una concentración de sustrato *cis* 19 mM. Las unidades de velocidad de reacción son mmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> de proteína y mM para la concentración de sustrato. A- Representación directa; B- Modelo de Hill; C- ajuste de los datos; D- Modelo Lineweaver-burk; E- Modelo de Eadie Hofstee; F- Modelo de Hanes. ○ [NADP] variable y [*cis*-naftalendiol] constante, × Sin NADP, □ Sin *trans*-naftalendiol.

Una explicación a porqué el cofactor presenta mayor afinidad cuando se lleva a cabo la catálisis con el sustrato *cis* podría ser que este sustrato favorezca la unión del NADP<sup>+</sup> aun cuando la afinidad de la enzima por el sustrato sea menor; aunque esto no se ha reportado en la literatura, podría ser factible si la estructura *cis* es estéricamente más afín al sitio de unión del dihidrodiol. Ese hecho explicaría por qué en los zimogramas la actividad es más intensa, ya que al ser mayor la afinidad de la enzima por su cofactor, el tiempo de reacción disminuiría permitiendo la acumulación de formazan antes de que los reactivos comiencen a degradarse. Sin embargo, no debe descartarse que estos datos hayan sido subestimados debido a que la cantidad de enzima pura obtenida tenía una concentración por debajo de 0.5 mg/mL en todos los eluidos obtenidos y solo se lograban recuperar un máximo de 500 μL. Por ello el número de ensayos fue limitado, y al no haberse corroborado la pureza de la enzima cabe la posibilidad de que haya interacciones con otras proteínas presentes en la

mezcla, por parte de los sustratos o de la enzima PDD1. Sin embargo, aún cuando los valores de afinidad y velocidad de reacción aquí reportados pudieran verse afectados por la falta de homogeneidad de la enzima, el análisis que se realizó permite estimar un modelo de comportamiento de un sistema cooperativo, por lo que se continuó con el análisis de los datos en este sentido.

Cofactor	Sustrato	$K_{app}$	$V_{max}$	$H$	$R^2$ promedio
NADP <sup>+</sup> 0 – 50 mM	<i>Cis</i>	12.74	6.30	2.97	0.92
	<i>Trans</i>	23.55	3.51	3.15	0.94

Tabla 5. Valores calculados para las constantes de unión del NADP<sup>+</sup>, cuando se usan los dos distintos sustratos, *cis* y *trans*.  $K_{app}$  (mM);  $V_{max}$  (mmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> de proteína).

Otro dato importante que se puede obtener de cinéticas logarítmicas es el número de Hill (H), mediante el cual se puede realizar una estimación del grado de cooperatividad y el número de sitios predichos de unión en la enzima para su sustrato (Bisswanger, 2008). Independientemente del sustrato usado, el valor calculado para esta constante fue de aproximadamente 3 (Tabla 5), suponiendo que la reacción no esté influenciada por otras proteínas presentes en la mezcla de reacción, dicho valor indicaría que el número mínimo de sitios de unión para el NADP<sup>+</sup> es de 3. Por otra parte, el índice de cooperatividad está dado por la expresión:

$$R_s = \sqrt[H]{81}$$

para H=3 se obtuvo  $R_s= 4.3$ .

Teniendo en cuenta que valores de  $R_s$  mayores a 81 indican cooperatividad negativa y valores menores cooperatividad positiva (Dixon, 1979; Bisswanger, 2008), el modelo de sistema descrito presentaría una alta cooperatividad positiva de tipo homotrópico por parte del NADP<sup>+</sup>, ya que dicha molécula modifica la afinidad de la enzima por el mismo NADP<sup>+</sup>.

Un punto que no debe perderse de vista es el hecho de que los valores de  $K_{app}$  obtenidos son un valor de la afinidad de la enzima por el sustrato descrita solo en la zona lineal de la gráfica (Figura 23B) ya que las porciones anterior y posterior describen el comportamiento

cuando la enzima se encuentra en sus estructuras de menor y mayor afinidad por el cofactor, las cuales han sido denominadas T y R, respectivamente (Bisswanger, 2008). Del análisis del gráfico anterior, se obtuvieron los valores de  $K_{app}$  para las estructuras T y R, los cuales se muestran en la Tabla 6. Se observa que, al igual que los valores mostrados en la Tabla 5, hubo una mayor afinidad de la enzima por el  $\text{NADP}^+$  cuando se añadió el sustrato *cis* que con el *trans*. Y en ambos casos la afinidad se incrementa cuando la enzima se encuentra en la estructura R, lo cual es un comportamiento esperado en un sistema cooperativo.

<i>K<sub>app</sub></i>		
Sustrato	T (menor afinidad)	R (mayor afinidad)
<i>Cis</i>	66.41	8.48
<i>Trans</i>	50.82	16.46

Tabla 6. Valores de  $K_{app}$  del  $\text{NADP}^+$  para las estructuras T y R cuando se usan los sustratos, *cis* y *trans*.  $K_{app}$  (mM).

## Determinación del mecanismo de reacción

El conocer las constantes de unión, permite comprender como ocurren las reacciones metabólicas. Sin embargo, para conocer los detalles de cómo ocurre la reacción, es necesario determinar el mecanismo de reacción de la enzima.

Como se mencionó en la sección anterior, la reacción que cataliza la enzima PDD1 involucra la *transformación* de dos sustratos y la liberación de dos productos, por lo que es denominada reacción bi-bi (Bisswanger, 2008). Este mecanismo de reacción es llevado a cabo por todas las aldo ceto reductasas (Penning, 2015). Sin embargo, no se sabe si dicho mecanismo es secuencial o ping-pong, y en caso de ser secuencial, si se lleva a cabo de forma ordenada o al azar. El mecanismo de reacción completo solo ha sido determinado para dos enzimas de este grupo concluyendo que presentan uno de tipo bi bi secuencial ordenado (Cooper *et al.*, 2007; Penning, 2015). En general, para las deshidrogenasas frecuentemente se observa un mecanismo secuencial ordenado, aunque en una alcohol deshidrogenasa se reportó de tipo Theorell Chance en el que, aunque es secuencial, el

complejo central es descompuesto tan rápidamente que su concentración es indistinguible (Fersht, 1980; Bisswanger, 2008).

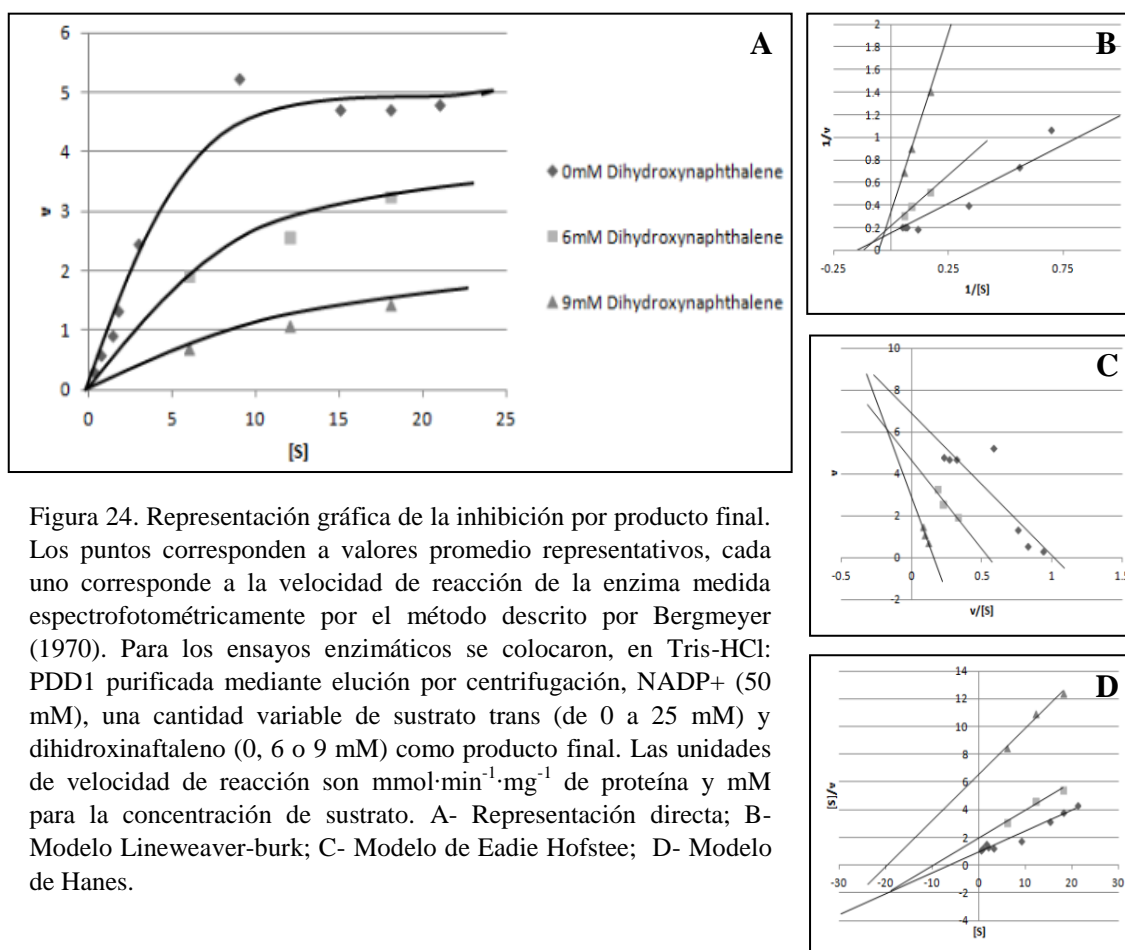


Figura 24. Representación gráfica de la inhibición por producto final. Los puntos corresponden a valores promedio representativos, cada uno corresponde a la velocidad de reacción de la enzima medida espectrofotométricamente por el método descrito por Bergmeyer (1970). Para los ensayos enzimáticos se colocaron, en Tris-HCl: PDD1 purificada mediante elución por centrifugación, NADP<sup>+</sup> (50 mM), una cantidad variable de sustrato *trans* (de 0 a 25 mM) y dihidroxinaftaleno (0, 6 o 9 mM) como producto final. Las unidades de velocidad de reacción son  $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína y mM para la concentración de sustrato. A- Representación directa; B- Modelo Lineweaver-burk; C- Modelo de Eadie Hofstee; D- Modelo de Hanes.

[1,2 - dihidroxinaftaleno] (mM)	$V_{max}$	$K_m$	$R^2$ promedio
0	5.77	5.42	0.97
6	4.763	9.142	0.93
9	2.939	19.171	0.96

Tabla 7. Valores calculados para las constantes de unión del sustrato *trans* cuando se añade 1,2-dihidroxinaftaleno como producto final.  $K_m$  (mM);  $V_{max}$  ( $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína)



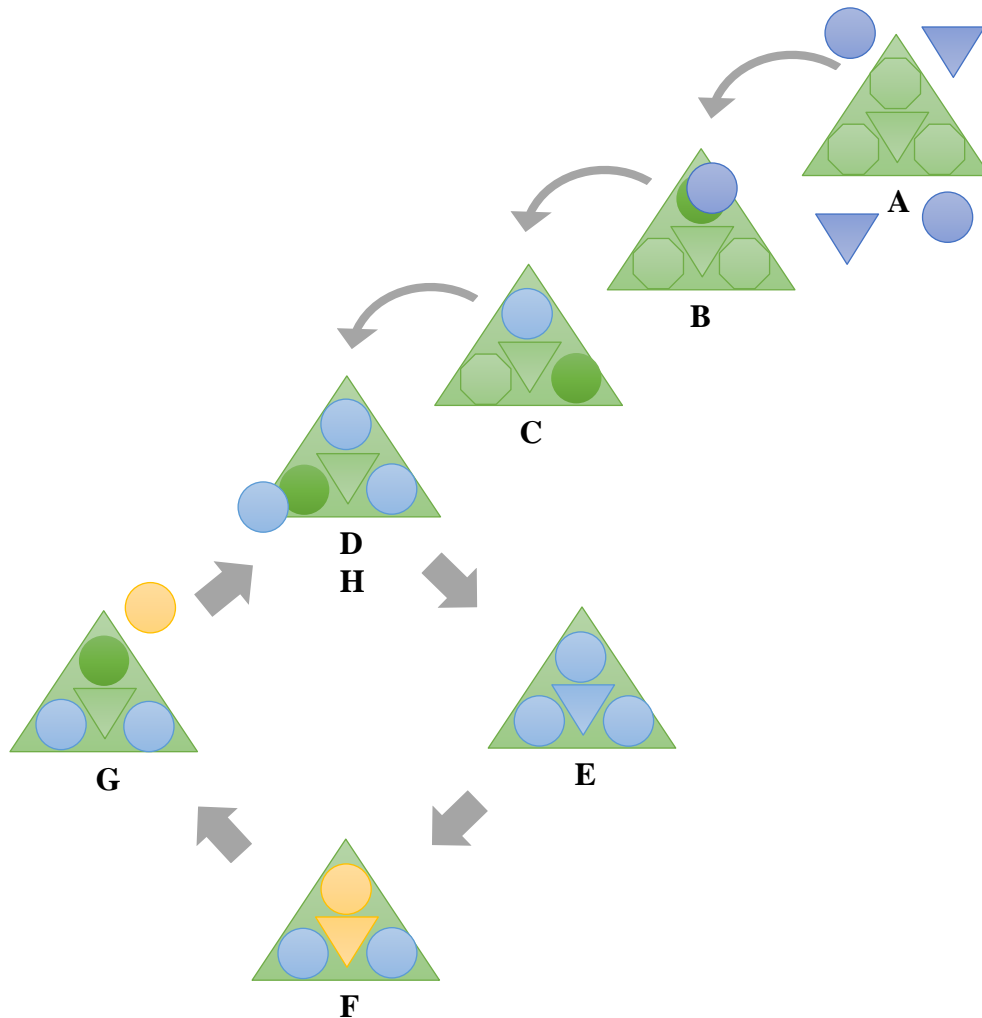


Figura 25. Modelo del mecanismo propuesto de reacción de la enzima PDD1. A, en ausencia de ligandos la proteína existe en una conformación T; B, al fijarse el primer  $\text{NADP}^+$  se induce un cambio conformacional en el sitio en que es fijado; C, el cambio conformacional es *transmitido* a los sitios vecinos; D, el segundo y tercer  $\text{NADP}^+$  son unidos con mayor velocidad; E, los sitios catalíticos son llenados; F, se lleva a cabo la reacción; G, los productos son liberados en el mismo orden que fueron reclutados, se liberan los sitios de unión y la enzima permanece en estado R; H, la enzima continúa la catálisis con velocidad máxima. ● Sitio de unión de  $\text{NADP}^+$  en estado tenso. ● Sitio de unión de  $\text{NADP}^+$  en estado relajado. ▼ Sitio de unión del dihidrodiol. ● Sustrato 1 –  $\text{NADP}^+$ . ▼ Sustrato 2 – dihidronaftalendiol. ● Producto 1 –  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ . ▼ Producto 2 – Catecol.

Un método para estudiar los mecanismos multi-sustrato es mediante el análisis del efecto inhibitorio de los productos sobre la velocidad de la reacción y la afinidad de la enzima por sus sustratos (Dixon, 1979; Bisswanger, 2008). Para esto, se realizó el estudio de inhibición

de la enzima PDD1 empleando dihidroxinaftaleno como producto final y variando la concentración del sustrato *trans*, con una concentración saturante de NADP<sup>+</sup> de 50 mM. Como se observa en la Figura 24 y Tabla 7, tanto la velocidad de la reacción como la afinidad de la enzima por el sustrato disminuyen lo cual es característico de una inhibición mixta (Dixon, 1979), lo cual también puede observarse en el análisis gráfico, lo que implica que el producto final compite por el sitio de unión con el sustrato disminuyendo la *K<sub>m</sub>* y también puede ejercer una regulación alostérica sobre la enzima modificando la *V<sub>max</sub>*. Dicho tipo de inhibición es característico de un mecanismo secuencial ordenado el cual podría ser el modelo de la catálisis llevada a cabo por la enzima PDD1.

Como se esquematiza en la Figura 25, de acuerdo con el número de Hill obtenido, se puede partir de que la enzima posee al menos 3 sitios de unión para el NADP<sup>+</sup>, en uno de los cuales el NADP<sup>+</sup> inducirá un cambio conformacional en el sitio donde se fije, dicho cambio puede ser transmitido a las subunidades vecinas, favoreciendo la unión de los siguientes ligandos. Una vez alcanzada la estructura R, la reacción se realizará a la máxima velocidad. Este mecanismo descrito es compatible con el modelo KNF el cual supone que la progresión de T a R ocurre de forma gradual y que cada subunidad cambia a medida que se fijan los ligandos (Dixon, 1979; Fersht, 1980; Bisswanger, 2008).

### **Estimación del peso molecular**

Obtención de anticuerpos contra la enzima PDD1

Los anticuerpos son herramientas bioquímicas importantes empleadas con éxito en varias técnicas de laboratorio, tienen un amplio rango de aplicaciones que incluyen selección, identificación y purificación de moléculas que no son visibles ni detectables de forma simple. El primer paso para poder identificar la enzima de interés, durante la purificación de la misma fue la obtención de anticuerpos policlonales contra la enzima PDD1. Las fracciones enriquecidas de IgG se obtuvieron como se detalla en la sección de Metodología, los anticuerpos fueron generados con lo que correspondía a una banda de actividad, por lo cual podrían reconocer a otras proteínas diferentes de la PDD1 contenidas en la misma muestra o reconocer más de una proteína si los anticuerpos no son muy específicos.

Se efectuó la titulación mediante dot blot (Figura 26) con extractos libres de células cultivadas con fenantreno como fuente de carbono, obteniendo un título de detección de 1:9 000. Dicha titulación y los dot blots subsecuentes se prefirieron a un ensayo ELISA, ya que se emplean extractos crudos que en ocasiones incluyen restos de hidrocarburos lo cual afecta la unión de los antígenos a las placas de ELISA. También se determinó la especificidad contra la banda en la que se encuentra la enzima mediante western blot (Figura 27), tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes. Aunque en condiciones nativas, la banda de reconocimiento de la enzima PDD1 fue muy difusa el patrón de localización de la enzima es muy similar a lo que se observa en el zimograma (Figura 13). En cuanto al reconocimiento en condiciones desnaturalizantes, el anticuerpo fue capaz de reconocer una banda de 84 y otra de 57 kDa, lo que sugería que la PDD1 podría estar formada por una de esas subunidades o ambas, aunque hasta el momento no hay reportes de DD formadas por subunidades distintas. Aunque también cabía la probabilidad de que los anticuerpos reconocieran otras proteínas formadas por subunidades de 57 y 84 kDa, diferentes de la enzima PDD1.

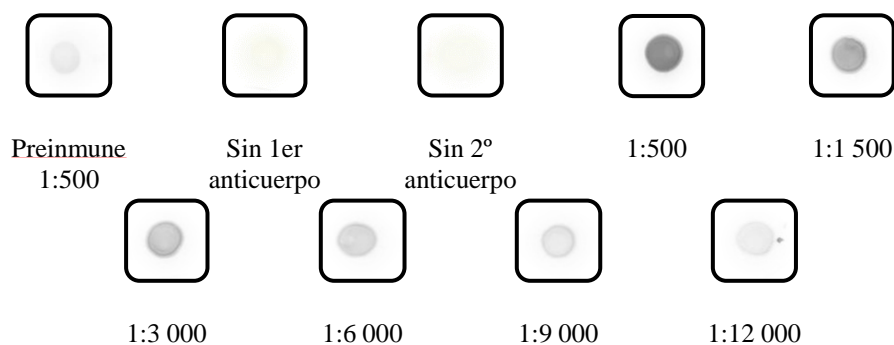


Figura 26. Titulación de anticuerpos anti-PDD1. Para esta titulación, se usó extracto libre células cultivadas con fenantreno como fuente de carbono. Los anticuerpos policlonales se obtuvieron de la inmunización de conejos con bandas de geles de poliacrilamida homogenizadas en la que se encontraba la proteína de interés.

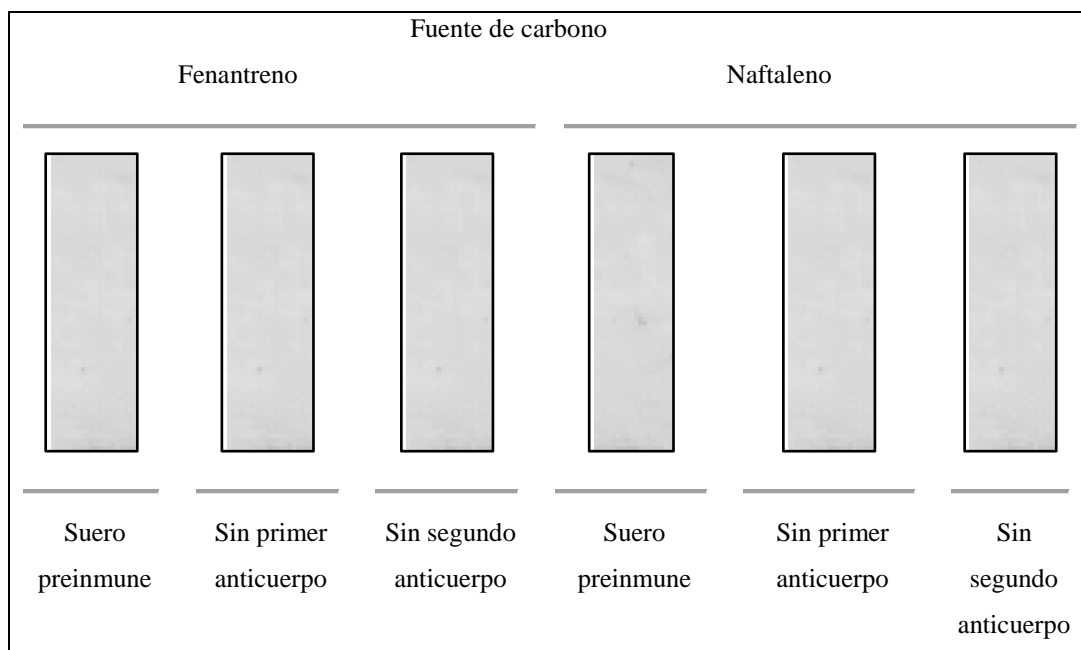
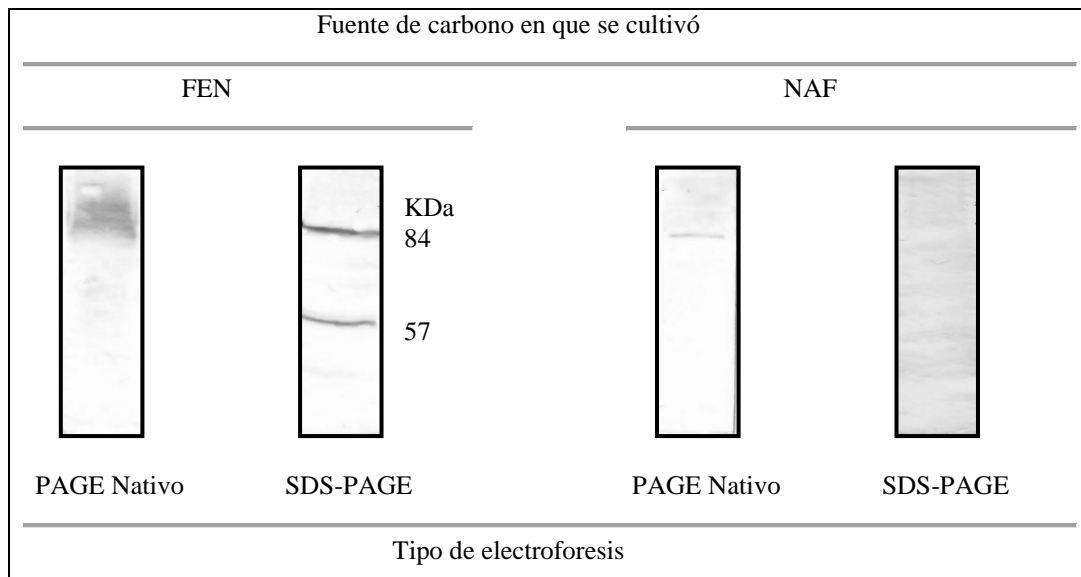


Figura 27. Reconocimiento en la banda de actividad *cis*- nnd por los anticuerpos, tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes. La electroforesis en los western-blot nativos se realizó empleando geles de poliacrilamida al 6%, mientras que para los desnaturalizantes se prepararon al 10%. Las muestras sometidas a la electroforesis provenían de cultivos libres de células cultivadas con fenantreno (FEN) o naftaleno (NAF) al 0.3% como fuentes de carbono. El primer anticuerpo se usó a una dilución de 1:10000.

Por otra parte, se observó que en los extractos libres de células cultivadas en presencia de naftaleno los anticuerpos reconocían una banda bien definida, sugiriendo el

reconocimiento de una proteína distinta de la PDD1 con igual migración que la enzima de interés. Una alternativa a dicho problema habría sido la purificación de anticuerpos específicos para la PDD1, sin embargo, como no se contaba con la enzima purificada a homogeneidad no fue posible obtener dichos anticuerpos.

Aun cuando cabía la posibilidad del reconocimiento de otras proteínas por parte de los anticuerpos, se emplearon en los siguientes experimentos, esperando tener al menos un indicio de la localización de la PDD1.

Peso molecular de la enzima PDD1 en conformación nativa

Aunque Penning (2015) menciona que las aldo-ceto reductasas son usualmente monómeros con un peso de alrededor de 37 kDa, en la base de datos Uniprot Database se enlistan enzimas tipo DD que poseen desde un peso menor a 10 kDa hasta algunas de 82 kDa. Para la enzima NDD se determinó un peso molecular de 197 kDa con cuatro subunidades de 49 kDa (Camacho, 2012), por lo que se esperaba un mayor peso para la enzima PDD1, teniendo como evidencia la movilidad electroforética que presenta respecto a esta última. Para la determinación del peso molecular en conformación nativa se utilizaron preparaciones de la enzima PDD1 mediante elución por centrifugación, los cuales se sometieron a cromatografía de exclusión por peso molecular. Inicialmente se empleó la resina Bio-gel A 0.5M y se obtuvieron tres fracciones con mayor actividad de la enzima PDD1 las cuales podrían contener la enzima PDD1 (Figura 28); sin embargo, el peso molecular calculado de dichas fracciones no fue superior a los 200 kDa, como se esperaba por la estimación respecto a la NDD, además no fue posible corroborar la presencia de la enzima mediante inmunodetección. Una posible explicación a la inconsistencia en estos resultados es que solo se haya obtenido el monómero de la PDD1 y que presente actividad. Además, aunque no se logró inmunodetectar ni observar la presencia de alguna proteína en SDS-PAGE, los pesos moleculares de dos de los picos con mayor actividad son muy cercanos a las bandas de 84 y 57 kDa que reconocen los anticuerpos.

Por otra parte, se realizó otra cromatografía con la resina Sephacryl S-300 empleando muestras obtenidas mediante purificación por electroelución y de elución por centrifugación. Sin embargo, en las fracciones obtenidas de estas cromatografías no se halló actividad *cis*-nnd mediante el método Bergmeyer (1970) y tampoco concentración significativa de proteína a 280 nm. A pesar de lo anterior, con los anticuerpos hubo un poco de reconocimiento en una fracción correspondiente a un peso de 126 kDa (Figura 29), la cual podría ser un dímero formado por subunidades de 57 kDa u otro tipo de componente que es co-purificado con la actividad de interés.

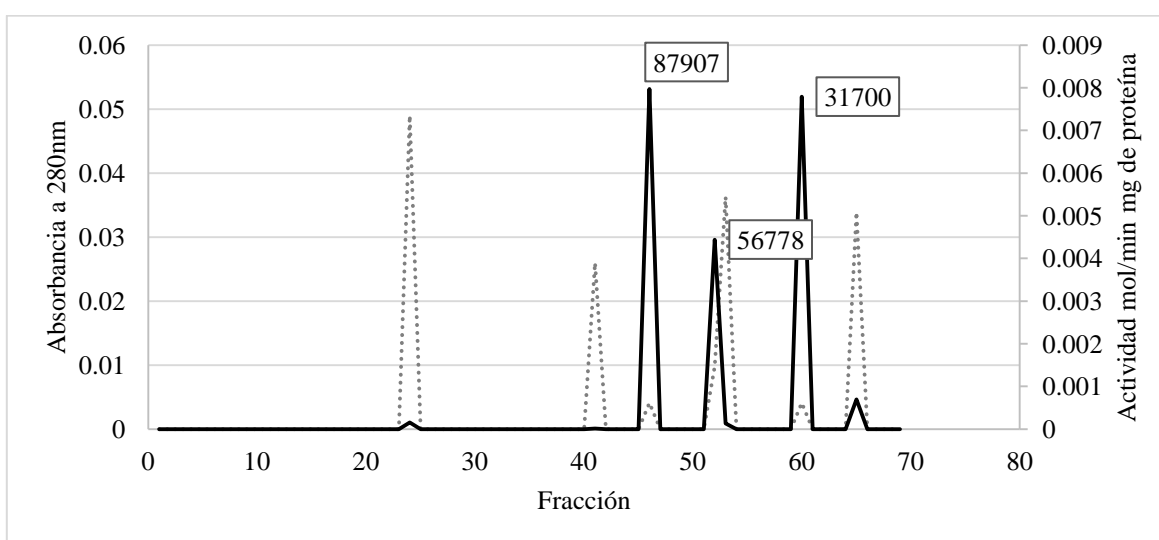


Figura 28. Perfil de proteína y actividad *cis*-nnd en fracciones separadas por cromatografía de exclusión molecular en Bio-gelA 0.5M. Se usó un purificado de la enzima PDD1 obtenido mediante elución por centrifugación a partir del corte de la banda de interés de geles de poliacrilamida nativos. Para la cromatografía, se usaron 1.5 mL de muestra con una concentración de 0.1 mg/mL medida a 280 nm. La columna se eluyó con Tris-HCl 50 mM. La línea continua representa la actividad específica medida en las fracciones colectadas, mientras que la línea discontinua es la cantidad de proteína medida a 280 nm. En la parte superior de los picos de mayor actividad se denota el peso molecular correspondiente a la fracción en Daltons.

Se ha reportado la existencia de varias DD diméricas (Hara *et al.*, 1991; Sato *et al.*, 1994; Arimitsu *et al.*, 1999; Asada *et al.*, 2000; Aoki *et al.*, 2001; Carbone *et al.*, 2008), algunas de estas enzimas participan en la formación de catecoles a partir de dihidrodioles de compuestos aromáticos; por lo que no sería extraño que la forma que se recupera de la enzima PDD1 sea un dímero, sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que existan

estructuras con más de dos subunidades, agregados funcionales, e inclusive interacciones inespecíficas con otras proteínas que disminuyan la movilidad relativa de la enzima y provoquen una migración anómala independiente de su conformación.



Figura 29. Inmunodetección de la PDD en fracciones separadas por cromatografía de exclusión molecular en la resina Sephacryl S-300. En la parte superior se muestra el peso molecular de la fracción en donde hubo reconocimiento, así como el de las fracciones adyacentes. Del lado derecho se muestran los controles, como control positivo se usó extracto libre de células crecidas en fenantreno, y como control negativo extracto libre de células crecidas con glucosa.

Una desventaja de la cromatografía es que se requiere una gran cantidad de proteína para hacer el análisis de su peso molecular (Tyagi *et al.*, 1993). Dado que las muestras con que se contaba no poseían esa característica, los resultados obtenidos mediante dicho método resultan poco confiables, por lo se recurrió al cálculo del peso molecular mediante el análisis en geles de acrilamida y por gráficos de Ferguson (Chrambach y Rodbard, 1971) de la movilidad en gel. Dicho análisis está basado en la relación entre la movilidad de una proteína y la concentración de la matriz en la que se desplaza, lo cual puede ser expresado como:

$$\text{Log}(\mu) = \text{Log}(\mu_0) - Kr(T)$$

donde  $\mu_0$  es la movilidad en solución y  $Kr$  es el coeficiente de retardo. La relación entre  $Kr$  y el radio de la proteína se deriva del modelo de Ogston y se puede representar de la siguiente forma:

$$Kr = \pi l'(r + R)^2 \times 10^{-16}$$

donde  $l'$  es la longitud de la fibra de la matriz (cm/gm),  $r$  es el radio de la fibra (nm), y  $R$  el radio de la proteína (nm). En la segunda ecuación se describe la relación entre el coeficiente de retardo y el tamaño de la proteína. La curva estándar puede construirse graficando el logaritmo del peso molecular de la proteína como una función de la raíz cuadrada de  $Kr$ . Este método permite analizar proteínas independientemente de la relación masa-carga (Werner, 1995). Con base a lo anterior, se realizó electroforesis en geles de concentraciones

de 6, 7, 8, 9 y 10 % (Figura 30). Al realizar el cálculo del peso molecular de la enzima se obtuvo un valor de 541 kDa (Figuras 31 y 32).

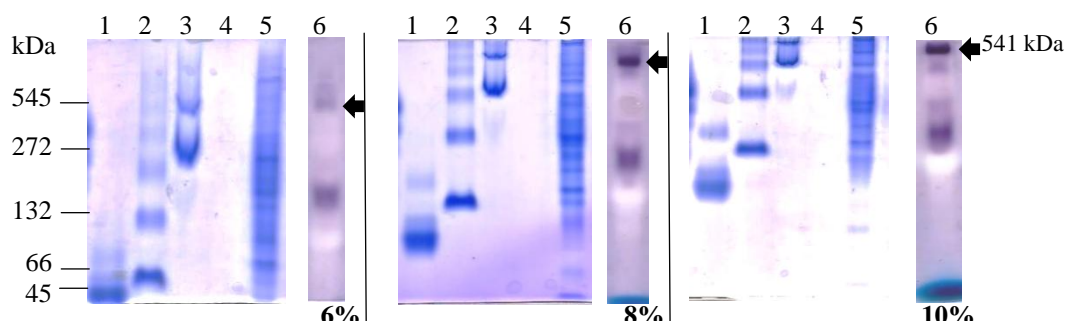


Figura 30. Geles de acrilamida representativos, empleados para generar los gráficos de Ferguson. En la esquina inferior derecha se señala el porcentaje de acrilamida que se usó en cada uno de ellos. En los carriles 1 a 3, se colocaron las proteínas estándar y se tiñeron con azul de Coomassie; 1- ovoalbúmina (45 kDa), 2- albúmina sérica bovina (dímero de 132 kDa y monómero de 66 kDa), 3- ureasa de frijol (hexámero de 545 kDa y trímero de 272 kDa). El extracto libre de células cultivadas en fenantreno como fuente de carbono se colocó en los carriles 5 y 6, 5- teñido con coomassie, 6- zimograma. La posición de la enzima PDD1 en los zimogramas se señala con una flecha del lado derecho. Los carriles 4 se dejaron vacíos.

Adicional al análisis por gráficos de Ferguson, empleando un enfoque propuesto por Tyagi *et al.* (1993), el extracto libre de células se analizó por electroforesis en condiciones nativas usando un gel en gradiente continuo de 4 a 12% (Figura 33) con el cual, mediante comparación directa de la movilidad relativa de las proteínas estándar con las de interés, se determinó un peso de 532 kDa para la PDD1, difiriendo solo en 9 kDa con respecto al obtenido mediante los gráficos de Ferguson; mientras que para la NDD se obtuvo un peso aproximado de 180 kDa el cual es muy cercano al ya reportado por Camacho (2012), este último lo consideramos como control interno del experimento.



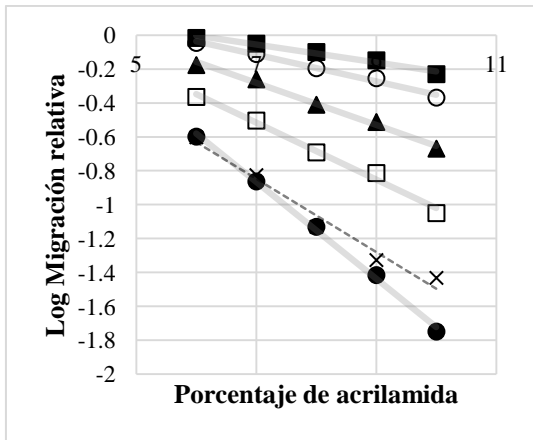


Figura 31. Gráfico de Ferguson para las proteínas estándar y la enzima PDD1. Se determinó la migración relativa (Rf) de cada proteína a cinco diferentes concentraciones de acrilamida; se graficó el logaritmo del Rf como una función del porcentaje de acrilamida. ■ ovoalbúmina, ○ monómero de albumina sérica bovina, ▲ dímero de albumina sérica bovina, □ trímero de ureasa de frijol, ● hexámero de ureasa de frijol, × PDD1.

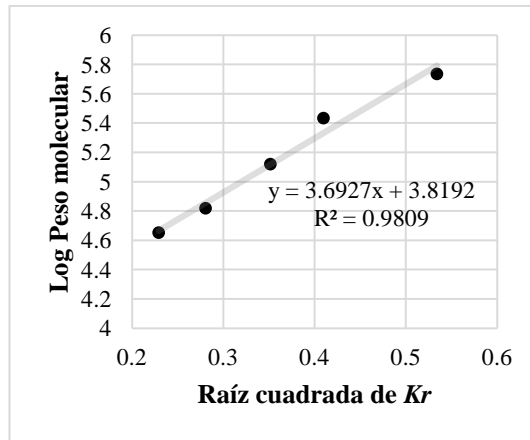


Figura 32. Curva estándar para la determinación de peso molecular por el método de Ferguson. Se graficó la raíz cuadrada de los valores de Rf contra el logaritmo del peso molecular de las proteínas estándar. La ecuación de la recta fue ajustada a los datos con una regresión lineal. Los puntos, de izquierda a derecha, corresponden a ovoalbúmina (45 kDa), monómero de albumina sérica bovina (66 kDa), dímero de albumina sérica bovina (132 kDa), trímero de ureasa de frijol (272 kDa) y hexámero de ureasa de frijol (545 kDa).

Tanto en los gráficos de Ferguson como en el gel en gradiente, el valor obtenido para el peso molecular de la enzima PDD1 en conformación nativa fue mayor a 500 kDa. Cada experimento se realizó por triplicado y se obtuvo un valor promedio de  $536 \pm 6.4$  kDa. Sin embargo, ese valor no fue obtenido en los resultados por cromatografía, lo que sugiere que la enzima pudo haber perdido estructuración cuaternaria al ser sometida a ese procedimiento (Ritchie, 2012), quedando únicamente dímeros o monómeros. Además de lo anterior, podría estar sujeta a modificaciones postraduccionales que alteran la carga de la enzima y originan cambios en su migración electroforética o interacción con las resinas de cromatografía.

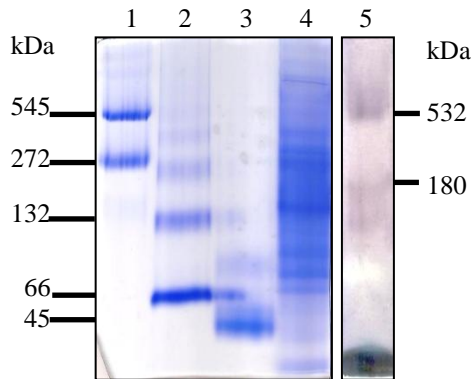


Figura 33. Gel de acrilamida en gradiente de 4 a 12%. En los carriles 1 a 3, se colocaron los marcadores de peso molecular y se tiñeron con azul de coomassie; 1- ureasa de frijol (hexámero de 545 kDa y trímero de 272 kDa), 2- albumina sérica bovina (dímero de 132 kDa y monómero de 66 kDa), 3- ovoalbúmina (45 kDa). El extracto libre de células cultivadas en fenantreno se colocó en los carriles 4 y 5, 4- teñido con azul de coomassie, 5- zimograma.

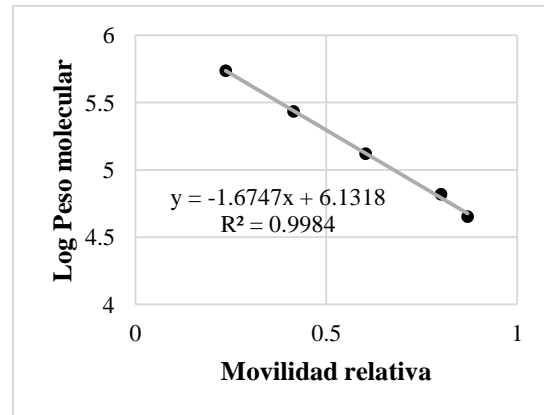


Figura 34. Curva estándar para la determinación de peso molecular mediante gel de poliacrilamida en gradiente. Se graficó la movilidad relativa contra el logaritmo del peso molecular de las proteínas estándar. La ecuación de la recta fue ajustada a los datos con una regresión lineal. Los puntos, de derecha a izquierda, corresponden a ovoalbúmina (45 kDa), monómero de albumina sérica bovina (66 kDa), dímero de albumina sérica bovina (132 kDa), trímero de ureasa de frijol (272 kDa) y hexámero de ureasa de frijol (545 kDa).

Peso molecular de las subunidades de la enzima PDD1 y probable estructuración

Para el cálculo del peso molecular de las posibles subunidades se emplearon purificados de la enzima PDD1 obtenidos mediante elución por centrifugación. La primera muestra se obtuvo de geles sin teñir, igual que como se obtuvieron las muestras para el estudio cinético.

Como se observa en la Figura 30, al aumentar la concentración de acrilamida la zona en que se localiza la proteína se comprime, por ello se realizaron zimogramas en geles al 10% y a partir de estos se cortó y eluyó por centrifugación la enzima, la muestra obtenida, se sometió a análisis por SDS-PAGE obteniendo una banda de 56 kDa (Figura 35).

La evidencia encontrada indica que la enzima PDD1 podría ser homopolimérica formada por subunidades de un peso molecular estimado de  $56.5 \pm 0.5$  kDa. En conformación nativa,

la enzima podría llegar a estar formada por 9 o 10 subunidades. Una estructuración posible de dichas subunidades podría ser la formación de núcleos diméricos o triméricos que, a su vez, podrían agruparse en conjuntos de 5 o 3 de ellos, respectivamente. Hasta el momento, no se ha reportado la existencia de DD mayores a un tetrámero, sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de estructuras más complejas dado el ambiente en el cual estas enzimas se expresan, tampoco es posible asegurar que la estructuración que se observa sea tal como podría ocurrir *in vivo*, ya que las condiciones del microambiente en el que se encuentran podrían ser distintas a aquellas bajo las que se realizó la experimentación. Además, cabe la posibilidad de que la interacción entre más de una proteína, todas ellas con subunidades de peso molecular similar, le confiera la movilidad observada en condiciones nativas a la enzima PDD1.

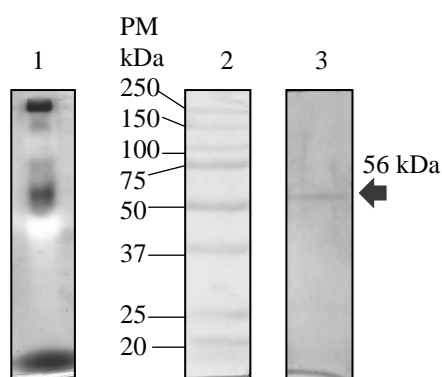


Figura 35. SDS-PAGE de PDD1 purificada de zimogramas. Carril 1, ejemplo del gel al 10% en condiciones nativas, en el que se compactó la banda de interés y se localizó mediante zimograma. Carriles 2 y 3 gel desnaturalizante al 10%; 2-marcadores de peso molecular preteñidos, se señala el peso al lado izquierdo; 3-Enzima PDD1 teñida con plata, del lado derecho se señala el peso molecular calculado.

### Constante catalítica y eficiencia del sistema

La determinación de los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  para los sustratos da una idea acerca de cómo es la afinidad de la enzima por estos, tomando como modelo los valores calculados para la afinidad de los sustratos *cis* y *trans*-naftalendiol se continuó con el análisis catalítico de la enzima PDD1, aun cuando al tener una muestra de mayor pureza podrían variar los valores ya calculados, se modeló el valor de  $K_{cat}$  para tener una idea de cómo es la interacción entre esta y las isoformas del sustrato. Con la estimación del peso molecular de la enzima PDD1, se calculó el valor de la  $K_{cat}$ , el cual describe el número máximo de moléculas de sustrato convertidas a producto por unidad de tiempo (Fersht, 1980). A partir de la expresión:

$$V_{max} = K_{cat}[E_0]$$

donde  $E_0$  representa la concentración de enzima total en la solución de reacción, se obtuvieron:

$$K_{cat} = 4.78 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ para el sustrato } cis$$

$$K_{cat} = 5.08 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ para el sustrato } trans$$

Una vez calculados los valores de las  $K_{cat}$ , se determinó la especificidad de los sustratos, mediante la relación:

$$\frac{K_{cat}}{K_m}$$

donde se relacionan las constantes catalíticas y de afinidad en una constante que describe la eficiencia con que es transformado el sustrato. Así, se obtuvieron las constantes de especificidad:

$$3.21 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ para el sustrato } cis$$

$$9.37 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ para el sustrato } trans$$

Los valores anteriores sugieren que la eficiencia es mayor cuando la enzima emplea el sustrato *trans*, aunque con ambos se tiene una alta eficiencia.

Una condición para el cálculo de la  $K_{cat}$  es que la enzima se encuentre pura en la mezcla de reacción (Bisswanger, 2008), al haber más de una enzima en los homogenados, los resultados de esta sección deben tomarse únicamente como comparativos entre sí, y con respecto a la eficiencia de catálisis con el sustrato naftalendiol en conformación *cis* o *trans*.

### **Identificación de la proteína candidata con actividad de PDD1 por espectrometría de masas MALDI-TOF**

A fin de conocer la identidad de la enzima PDD1 se realizó la purificación de dicha proteína mediante elución del homogenado obtenido, se sometió a SDS-PAGE (Figura 36) y la banda obtenida se cortó para ser analizada por espectrometría de masas MALDI-TOF. En el análisis se encontraron 7 proteínas distintas en total. En la Tabla 8 se enlistan las funciones de las proteínas identificadas, en ella se puede observar que únicamente dos se

ellas corresponden a oxidoreductasas que podrían tener la actividad DD. Sin embargo, la S2JCY5 es una oxidoreductasa involucrada en el catabolismo de tirosina y fenilalanina, además, en el análisis in silico (Tabla 9) no se halló que dicha proteína contenga el motivo de unión a NADP necesario para la actividad DD, conocido como plegamiento Rossmann (Arboledas, 2011). Aunque el análisis de proteínas partícipes en la degradación de HPAs en *Celeribacter indicus* P73 indica que podría estar relacionada con la escisión de anillos aromáticos catalizando la inserción de oxígeno en la molécula (Cao *et al.*, 2015). Por lo anterior, la proteína S2JH17 se consideró como la mejor candidata ya que además de presentar los dominios característicos de una oxidoreductasa, presenta una secuencia de plegamiento Rossmann y una alta probabilidad de unión de NADP a dicho dominio (Tabla 9).

En cuanto al resto de las proteínas encontradas, las más abundantes fueron enolasas y, aunque hasta el momento no se ha relacionado este tipo de proteínas con la degradación de HPAs, en estudios en *Mycobacterium vanbaalenii* (Kim *et al.*, 2004) y en raíces de trigo (Shen *et al.*, 2016), se ha observado que en presencia de HPAs aumenta la expresión de enolasa, así como de otras proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos; de igual manera, también se ha reportado el aumento en la expresión de fumarasa, que es otra de las enzimas encontradas en la muestra (Kim *et al.*, 2004) y, aunque no se ha reportado, la expresión de la fosfoglicerato cinasa también podría verse aumentada por la presencia de fenantreno ya que es una enzima que participa en la glicólisis. Tampoco se ha reportado alguna relación entre la 4-aminobutirato aminotransferasa y la presencia de HPAs, sin embargo, el análisis de redes de proteínas en *Mus musculus* indica que la enzima es co-expresada con una aldehído-deshidrogenasa que a su vez se co-expresa con una aldo-ceto reductasa NADP dependiente, la cual tiene un papel importante en la activación de xenobióticos como los HPAs (Szklarczyk *et al.*, 2015).

Lo anterior sugiere que las proteínas encontradas podrían ser sobre expresadas en presencia de fenantreno y, debido al peso molecular tan cercano que tienen, comigrar en los geles electroforéticos, o bien participar en el proceso de metabolización del fenantreno de forma conjunta.

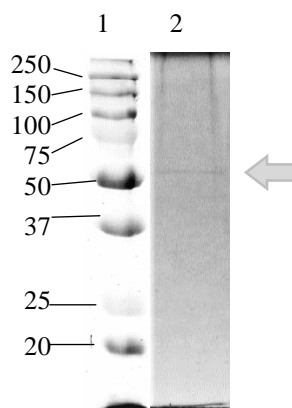


Figura 36. SDS-PAGE de la muestra usada en el análisis MALDI-TOF. Se empleó un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10%. Carril 1- marcadores de peso molecular, 2 homogenado obtenido mediante purificación por elución. La flecha de la derecha indica la banda que fue cortada para el análisis por espectrometría de masas.

Aunque no se tiene una sola proteína, es poco probable que haya más de una actividad *cis*-o *trans*-nnd ya que, a excepción de la S2JH17, para ninguna otra enzima se han reportado actividades o presentan dominios que pudiesen llevar a cabo la oxidación del diol, por otra parte, no se puede excluir la posibilidad de interacciones inespecíficas entre los sustratos y las otras proteínas, o entre proteína-proteína, que pudieran alterar las mediciones de actividad.

En particular para los valores de  $K_m$ ,  $V_{max}$  y mecanismo de reacción, son válidos siempre y cuando solo haya una actividad nnd en el homogenado (Acker y Auld, 2014); no así con la  $K_{cat}$ , ya que para la determinación de esta es fundamental que la concentración de proteína presente en la mezcla de reacción corresponda únicamente a la enzima analizada (Bisswanger, 2008).

Ya que la especificidad de los sustratos fue calculada con la  $K_{cat}$ , la cual podría no representar la catálisis correctamente, puede tomarse como un referente a manera de comparar la especificidad entre los dos sustratos usados. Por otro lado, en las curvas sigmoides pueden observarse efectos artificiales debido a la alta dilución de la enzima en solución, al medir la actividad en un rango de baja a alta concentración la velocidad a bajas

concentraciones puede ser mucho menor debido a ese efecto (Bisswanger, 2008), ya que, de acuerdo a los resultados de la espectrometría MALDI-TOF, la cantidad de la enzima PDD1 se encuentra en una proporción baja, podría ser que las cinéticas de unión de  $\text{NADP}^+$  estuvieran alteradas debido a dicho efecto; aunque no se observó lo mismo con los sustratos *cis*- y *trans*- naftalendiol, ya que, desde bajas concentraciones se midió una alta velocidad de reacción. De existir un efecto sigmoide debido a la baja concentración de la enzima se observaría tanto para el naftalendiol como para el cofactor, lo cual no ocurrió, pero cabe la posibilidad de interacciones del cofactor con otras de las enzimas, como se menciona a continuación.

Otra implicación de la presencia de más de una enzima en las preparaciones es la posible interacción inespecífica de los sustratos, lo que provocaría un secuestro de los mismos y la alteración de las mediciones realizadas. Hasta el momento, lo anterior no se ha reportado para ninguna de las enzimas encontradas en la mezcla; además de ello, el análisis de las secuencias no muestra probabilidad de sitios de unión a  $\text{NADP}^+$  a excepción de la oxidoreductasa y una baja probabilidad para la fosfoglicerato cinasa (Tabla 10).

Aunque es poco probable que en los homogenados haya dos enzimas produciendo la actividad ndd, resulta conveniente demostrar que lo observado es producto de una sola enzima. No obstante, a los resultados aquí presentados, es necesario realizar la expresión heteróloga de la enzima, de modo que puedan ser purificadas y caracterizadas de forma precisa.

Adicional al análisis *in silico*, se realizó el modelado de la estructura tridimensional de la proteína S2JH17 (Figura 37) y un análisis más detallado de la secuencia en el sitio PROSITE (De Castro *et al.*, 2006) (Figura 38). El diagrama de la estructura de la proteína muestra los motivos característicos del plegamiento de Rossmann que une dinucleótidos, el cual, para la unión de NADH, está compuesto por una estructura  $\alpha/\beta$  simétrica compuesta por dos mitades,  $\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3$  y  $\beta_4\alpha_4\beta_5\alpha_5\beta_6$ , con una  $\alpha$ -hélice ( $\alpha_3$ ) conectando las láminas  $\beta_3$  y  $\beta_4$ . Aunque en la secuencia S2JH17 se cuentan 7 motivos  $\alpha/\beta$  conserva la estructura típica de unión a nucleótidos (Dym y Eisenberg, 2001).

Acceso	Descripción y funciones reportadas	Score	Cove rage
S2J8L6	Enolase OS=Mucor circinelloides f. circinelloides (strain 1006PhL) GN=HMPREF1544_07221 PE=3 SV=1 - [S2J8L6_MUCC1] Liasa multifuncional, ya que adicional a la deshidratación de D-2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato en la glicólisis, funciona como receptor de unión a plasminógeno y se le ha relacionado a respuestas en hipoxia, choque térmico y además organización de citoesqueleto (Pancholi, 2001)	74,46	38,13
S2K9S5	Enolase OS=Mucor circinelloides f. circinelloides (strain 1006PhL) GN=HMPREF1544_04158 PE=3 SV=1 - [S2K9S5_MUCC1] Mismas funciones que las reportadas para la S2J8L6	19,68	15,6
S2JCY5	Homogentisate 1,2-dioxygenase OS=Mucor circinelloides f. circinelloides (strain 1006PhL) GN=HMPREF1544_06861 PE=4 SV=1 - [S2JCY5_MUCC1] Homogentisato 1,2- dioxygenasa Oxidoreductasa involucrada en el catabolismo de tirosina y fenilalanina. Cataliza la reacción: homogentisato + O <sub>2</sub> = 4-maleilacetoacetato + H <sup>+</sup> (Binns <i>et al.</i> , 2009)	14,19	11,31
A0A168KAP0	Phosphoglycerate kinase OS=Mucor circinelloides f. lusitanicus CBS 277.49 GN=MUCCIDRAFT_156455 PE=3 SV=1 - [A0A168KAP0_MUCCL] Fosfoglicerato quinasa Transferasa que cataliza la reacción reversible: 1,3-difosfo-glicerato + ADP = 3-fosfoglicerato + ATP (Binns <i>et al.</i> , 2009)	22,58	17,07
A0A162TPC0	Fumarate hydratase OS=Mucor circinelloides f. lusitanicus CBS 277.49 GN=McFumHa PE=3 SV=1 - [A0A162TPC0_MUCCL] Fumarato hidratasa Liasa encargada de catalizar la reacción: (S)-malato = fumarato + H <sub>2</sub> O (Binns <i>et al.</i> , 2009)	13,38	9,31
S2KE81	4-aminobutyrate aminotransferase OS=Mucor circinelloides f. circinelloides (strain 1006PhL) GN=HMPREF1544_02419 PE=3 SV=1 - [S2KE81_MUCC1] 4- aminobutirato aminotransferasa Transferasa que cataliza la transferencia de grupos amino desde un metabolito a otro (Binns <i>et al.</i> , 2009)	11,43	10,91
S2JH17	Oxidoreductase OS=Mucor circinelloides f. circinelloides (strain 1006PhL) GN=HMPREF1544_03543 PE=4 SV=1 - [S2JH17_MUCC1] Oxidoreductasa Cataliza una reacción redox con dos sustratos, uno actúa como donador de electrones siendo oxidado, mientras que el otro es reducido actuando como aceptor (Binns <i>et al.</i> , 2009)	10,58	12,72

Tabla 8. Identidad y funciones descritas para las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.



Acceso	Identificación	Secuencias encontradas	Número de péptidos
S2J8L6	Enolasa	IEEELGEGNSIYAGENFR	1
		YGLDATNVGDEGGFAPNIQK	2
		SGETEDTTIADLVGLR	1
		AAVPSGASTGIHEAVELR	2
		LAMQEFMILPTGAK	1
		LAMQEFMILPTGAK	1
		LAMQEFMILPTGAK	2
		GVPLYVHFADLSGSK	1
		LGANAILGVSLAVAK	1
		IGMDCAASEFYK	1
		IGSEVYHNLQSVIK	1
		AVANVNDVIGPK	2
		IEEELGEGNSIYAGENFR	1
		ELTALYNSFAEK	1
S2K9S5	Enolasa	VDFNVPLKDGEITNNR	1
		EGATTIIGGGDTATAALK	2
		AVLDAVEATK	1
		AHSSMVGVELPQR	1
		ELPGVTALSSKN	1
S2JCY5	Homogentisato 1,2- dioxigenasa	LGANALLGVSLAVAK	1
		GNPTVEVEVSTAK	1
		EGLDLLVTAIK	1
		LTGQQLSELYK	1
		IGSEVYHHLK	1
		IEEELGK	1
A0A168KAP0	Fosfoglicerato quinasa	FGGEDILITPTQIR	1
		SGLGIHIYSANTDMGK	1
		VAPNEIAVIQR	1
		SVNDLLVSK	1
A0A162TPC0	Fumarato hidratasa	LYNLAQGGTAVGTGLNTR	1
		VAEISNITGLPFK	1
		AAATVNMTYGMDAK	1
S2KE81	4- aminobutirato aminotransferasa	VVASVAAAVENLK	1
		GIASGYPLSAIVSR	1
		DTAAILIEPVQEGGGYVPPK	1
S2JH17	Oxidoreductasa	LFITGGDSGIGR	1
		GSQQLVDYSSTK	1
		MDPQPAVGENYK	1

Tabla 9. Péptidos identificados mediante la espectrometría de masas.

Acceso	Identificación	PM (kDa)	pI	Unión a NADP	Probabilidad de glicosilación	Localización subcelular
S2J8L6	Enolasa	47	5,8	0	0,05	-
S2K9S5	Enolasa	47,2	5,39	0	0,00	-
S2JCY5	Homogentisato 1,2-dioxigenasa	49	5,81	0	0,08	-
A0A168KAP0	Fosfoglicerato quinasa	44,5	7,02	0.04	0,04	-
A0A162TPC0	Fumarato hidratasa	53,3	7,12	0	0,07	Mitocondria
S2KE81	4- aminobutirato aminotransferasa	47,9	7,78	0	0,07	-
S2JH17	Oxidoreductasa	30,6	6,73	0.55	0,08	-

Tabla 10. Características predichas a partir de las secuencias de aminoácidos. Los valores de PM y pI fueron calculados mediante la espectrometría de masas MALDI-TOF. La unión a cofactor muestra la probabilidad de unión para NADP, cuando existe un motivo para plegamiento de Rossmann, fue determinada usando Cofactory v.1.0 (Geertz-Hansen *et al.*, 2014). La probabilidad de glicosilación se determinó como se explica en metodología, con los datos generados por el análisis realizado en la plataforma GlycoEP (Chauhan *et al.*, 2013). Con el software TargetP 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000) se determinó la localización subcelular, las celdas vacías corresponden a secuencias carentes de señalización. También se analizó la presencia de dominios transmembranales mediante el software TMHMM Server v. 2.0 (Sonnhammer, 1998), ninguna de las secuencias los presentó por lo que se omitió el dato.

Respecto al análisis de la secuencia, del aminoácido 175 al 203 se encontró un conjunto de aminoácidos característicos de la familia de deshidrogenasas/reductasas de cadena corta con una Tirosina (188) como sitio aceptor de protón. Algo adicional que este análisis mostró fueron cuatro posibles sitios de N-miristoilación, la cual podría favorecer la unión de los HPAs a la enzima ya que este tipo de modificación favorece las interacciones proteína-lípido mediante el aumento de la hidrofobicidad de la estructura proteica, lo que también aumentaría la afinidad de la estructura por los HPAs (Farazi, 2001). También se encontraron varios sitios de fosforilación que podrían estar involucrados en la regulación de la enzima. Finalmente se analizó la secuencia en el sitio LocSigDB (King y Guda, 2007), dicho análisis encontró secuencias de señalización hacia lisosomas (7-12, 17-22, 179-184,

256-260 aa), retículo endoplásmico (7-10, 33-36, 71-74, 75-78, 99-102, 110-113, 137-140 aa) y Golgi (205-210 aa).

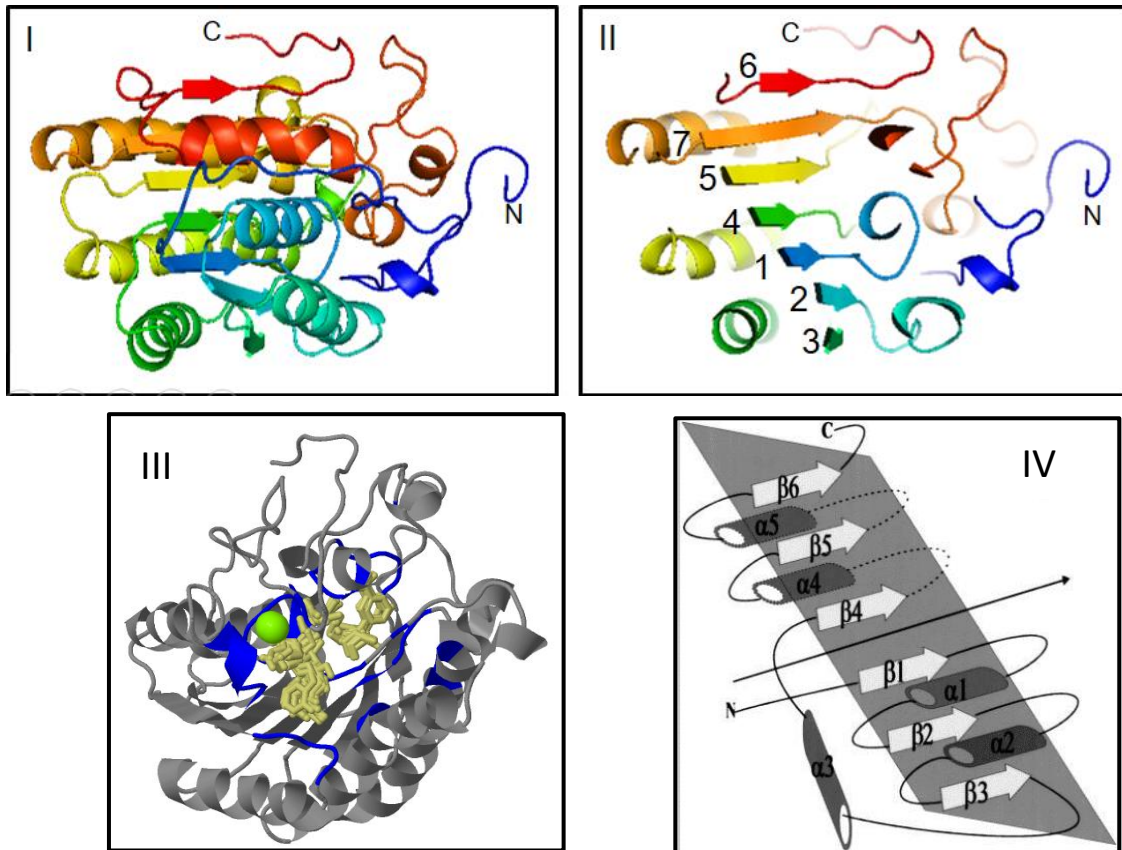


Figura 37. Modelo tridimensional de la proteína S2JH17. I y II; diferentes vistas del esquema. III; predicción de la unión de los ligandos, NADP-beige, diol-verde, sitios de interacción con la proteína- azul. IV; topología de las deshidrogenasas que unen NADH, los cilindros representan  $\alpha$ -hélices y las flechas las láminas  $\beta$ . (tomado de Dym y Eisenberg, 2001).

tr-S2JH17-S2JH17_MUCC1	36	39	PS00009 AMIDATION	.	.	.	kGKK
tr-S2JH17-S2JH17_MUCC1	43	46	PS00006 CK2_PHOSPHO_SITE	.	.	.	TggD
tr-S2JH17-S2JH17_MUCC1	44	49	PS00008 MYRISTYL	.	.	.	GGdsGI
tr-S2JH17-S2JH17_MUCC1	48	53	PS00008 MYRISTYL	.	.	.	GIGrSV
tr-S2JH17-S2JH17_MUCC1	57	60	PS00006 CK2_PHOSPHO_SITE	.	.	.	SamE
tr-S2JH17-S2JH17_MUCC1	80	82	PS00005 PKC_PHOSPHO_SITE	.	.	.	TaK
tr-S2JH17-S2JH17_MUCC1	124	127	PS00001 ASN_GLYCOSYLATION	.	.	.	NASE
tr-S2JH17-S2JH17_MUCC1	133	136	PS00006 CK2_PHOSPHO_SITE	.	.	.	SInE
tr-S2JH17-S2JH17_MUCC1	145	147	PS00005 PKC_PHOSPHO_SITE	.	.	.	TfK
tr-S2JH17-S2JH17_MUCC1	155	158	PS00001 ASN_GLYCOSYLATION	.	.	.	NVTK
tr-S2JH17-S2JH17_MUCC1	172	175	PS00001 ASN_GLYCOSYLATION	.	.	.	NTTS
tr-S2JH17-S2JH17_MUCC1	175	203	PS00061 ADH_SHORT	.	.	(0)	SvtaykgsqLvdYSSTKGAIvFTTrSLS
tr-S2JH17-S2JH17_MUCC1	190	192	PS00005 PKC_PHOSPHO_SITE	.	.	.	StK
tr-S2JH17-S2JH17_MUCC1	193	198	PS00008 MYRISTYL	.	.	.	GAivTF
tr-S2JH17-S2JH17_MUCC1	229	232	PS00006 CK2_PHOSPHO_SITE	.	.	.	SftE
tr-S2JH17-S2JH17_MUCC1	278	283	PS00008 MYRISTYL	.	.	.	GTiINT

Figura 38. Salida de datos del análisis en el sitio PROSITE (De Castro et al., 2006).

Anteriormente, al obtener las primeras estructuras cristalinas de deshidrogenasas, se formuló la hipótesis de que las deshidrogenasas evolucionaron de la fusión de un gen que codifica el dominio de fijación a NAD<sup>+</sup> con una serie de genes que codifican dominios catalíticos separados, de este modo se obtiene una familia de enzimas con especificidad variada (Fersht, 1980), se puede observar que la secuencia obtenida responde a esta hipótesis, al tener gran similitud con otras enzimas de funciones semejantes en el dominio de unión a dinucleótido y en la probable estructura terciaria.

### **Localización subcelular de la actividad PDD1**

Previamente, en el trabajo de Camacho (2012), en un esfuerzo para determinar por gradientes isopícnicos de sacarosa la localización de la enzima NDD, se detectó la actividad *cis*-ndd a una densidad de 1.182 g/cm<sup>3</sup> y la actividad de peroxidasa en 1.192 g/cm<sup>3</sup>, que se correlaciona con la presencia de peroxisomas. La relevancia de estos hallazgos radica en que no se ha descrito en donde se lleva a cabo la degradación de compuestos policíclicos y, en el trabajo de Camacho (2012), la cercanía de las densidades en las que se encontraron las actividades mencionadas sugería que la degradación de naftaleno ocurría en microsomas, posiblemente distintos de los peroxisomas. Por otra parte, en algunos estudios se han encontrado HPAs activados en microsomas, tanto en células de mamífero como de hongos, (Hopkins, 1968; Howes y Hunter, 1968; Vyas *et al.*, 1983; Kumar *et al.*, 1995, Bezalel *et al.*, 1997), pero no se ha establecido si alguna actividad enzimática relacionada con la degradación de HPAs se halla en la población microsomal.

Para corroborar lo anterior y determinar si el mismo fenómeno ocurría cuando se empleaba otro HPAs diferente al naftaleno, se realizaron gradientes isopícnicos de sacarosa con muestras provenientes de cultivos crecidos en glucosa, naftaleno y fenantreno como fuente de carbono (Figura 39). En el gradiente proveniente del cultivo con glucosa, tanto la actividad de peroxidasa como *cis*-ndd fueron muy bajas en comparación a los valores en los cultivos con hidrocarburos; en particular, la actividad *cis*-ndd.

Se ha reportado que la población peroxisomal está sujeta a cambios, y que cuando los organismos se encuentran en condiciones de estrés dicha población puede aumentar su número y tamaño, debido a la necesidad de metabolizar una mayor cantidad de sustancias nocivas para la célula (Thieringer *et al.*, 1991; Smith y Aitchison, 2013). Este hecho se puede observar en el cambio de densidad en donde se sitúa la actividad peroxidasa cuando la cepa se crece en presencia de hidrocarburos, en comparación al cultivo en glucosa.

Así mismo, se observa que, al igual que en el trabajo de Camacho (2012), las máximas actividades *cis*-n-dd y peroxidasa se encuentran en densidades muy cercanas, aunque contrario al trabajo citado, se encontró la actividad *cis*-n-dd posterior a la actividad de peroxidasa. Se piensa en dos posibles causas que expliquen este hecho; primero, que anteriormente solo se realizó la centrifugación del gradiente durante cuatro horas en las cuales los peroxisomas pudieron llegar a la isopicnicidad pero no así las vesículas que contenían la actividad *cis*-n-dd, en este trabajo se realizaron centrifugaciones por cinco, seis y siete horas observando que después de las cinco horas la actividad *cis*-n-dd se encontraba en la fracción de  $1.208 \text{ g/cm}^3$  de densidad; y segundo, qué en el trabajo anterior las actividades reportadas corresponden a la velocidad de la enzima, y el que la enzima procese con mayor velocidad el sustrato no forzosamente es equivalente a mayor cantidad de enzima ya que la velocidad puede estar afectada por la interacción con otros sustratos y proteínas, en este trabajo se midió la formación total de producto final, el cual independientemente de la velocidad de la enzima es equivalente a mayor cantidad de enzima funcional.

En el caso del gradiente con el cultivo en fenantreno, las actividades de interés se encontraron traslapadas, sin embargo, esos resultados no fueron muy claros puesto que la densidad del fenantreno es de  $1.2 \text{ g/cm}^3$  por lo que, en la región en que se encuentran las actividades, hay una gran cantidad del hidrocarburo que interfiere con las mediciones realizadas.

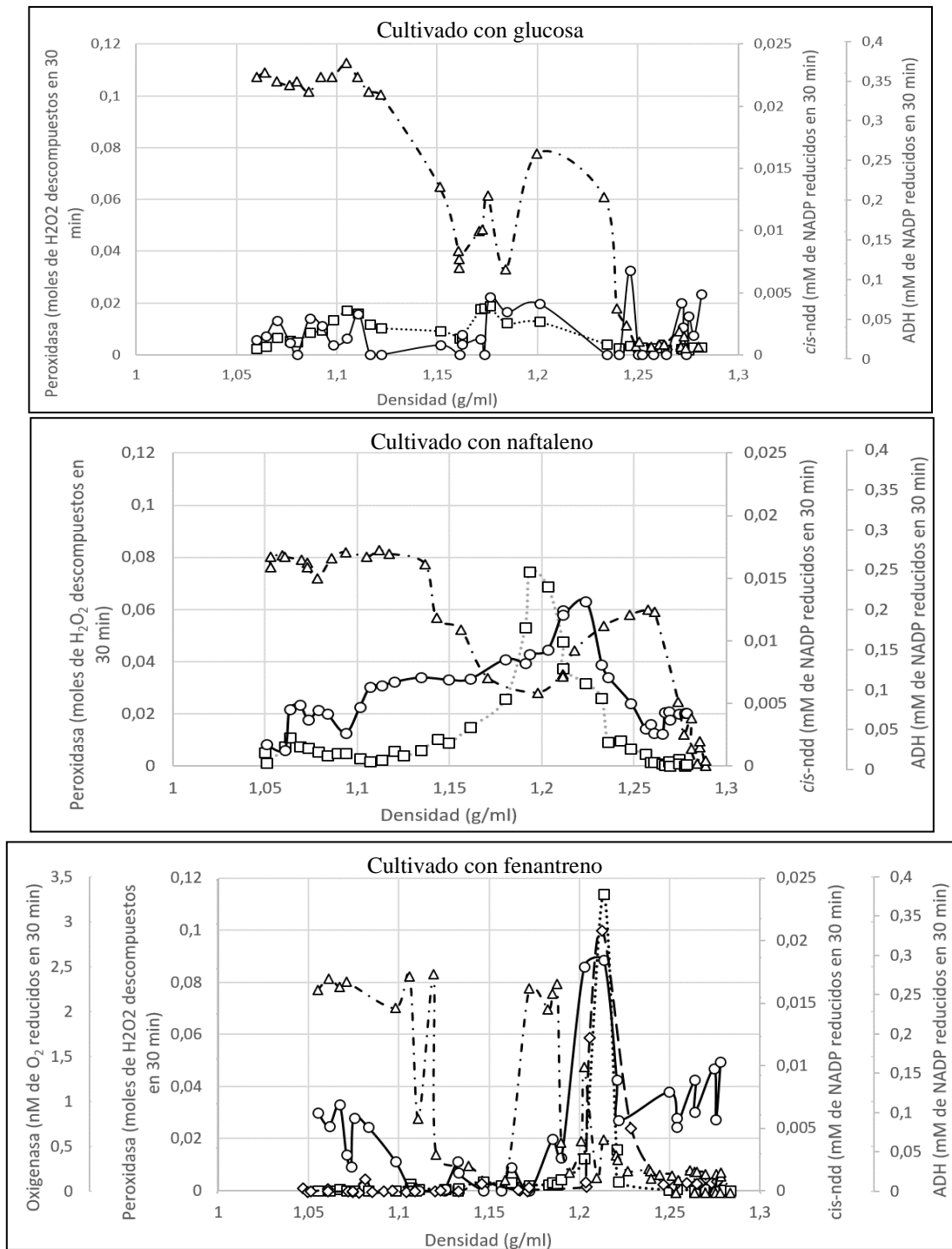


Figura 39. Distribución de actividad ADH, cis-ndd y peroxidasa en gradientes continuos de sacarosa del 10 al 60%. Los extractos usados se obtuvieron por congelación con N<sub>2</sub> y ruptra abrasiva de micelio crecido en presencia de la fuente de carbono que se indica en cada gráfica. Actividad *cis*-ndd —○—, ADH —△—, peroxidasa —□— y oxigenasa —◇—.

Además de las actividades ya mencionadas se midió la actividad alcohol deshidrogenasa (ADH) como un marcador de contenido citosólico, aunque también se ha reportado su presencia en la fracción microsomal y mitocondrias (Crichton *et al.*, 2007), como se observa en las gráficas (Figura 39), la mayor actividad ADH medida en los gradientes, se encontró en las primeras fracciones, lo cual corresponde con la menor densidad del contenido citoplásmico. También la actividad de oxigenasa fue medida, aunque únicamente en el gradiente del cultivo en fenantreno, se observó el pico máximo de actividad a la misma densidad que la actividad *cis*-ndd sugiriendo que las enzimas responsables de las actividades oxigenasa y *cis*- ndd se localizan en las mismas fracciones del gradiente.

## CONCLUSIONES

La localización de la fluorescencia debida al fenantreno y pireno sugieren que los HPAs son internalizados y degradados en las células de la cepa YR-1.

Se observó que la enzima puede catalizar la transformación de *cis* y *trans*- naftalendiol en zimogramas, la mejor detección de la actividad *cis*-nnd de la enzima PDD1 se observó a 37°C y en un rango de pH de 8 a 10.

Mediante electroforesis nativa, se estimó que la masa molecular de la enzima PDD1 en conformación nativa es de 536±6.4 kDa.

Con la enzima PDD1 purificada parcialmente, se determinó un pI de 8 y que está formada por subunidades de 56±0.5 kDa.

Se observó cooperatividad con el NADPH y la eficiencia catalítica parece ser mayor con el sustrato en conformación *trans* que con el *cis*.

Con el estudio de inhibición por producto final, se determinó un mecanismo de reacción *bi*bi secuencial ordenado.

La secuencia más probable correspondiente a la enzima PDD1 es la oxidasa anotada con el número de acceso S2JH17.

Se sugiere que la actividad *cis*-nnd se localiza en microvesículas.

En conjunto, los resultados sugieren que los HPAs son transportados al interior de la célula y acumulados en microvesículas, en donde podrían realizarse las primeras fases de su degradación.



## PERSPECTIVAS

Como investigación inmediata a este trabajo se sugiere abordar dos objetivos:

- Verificar que la secuencia de la oxidoreductasa S2JH17 es transcrita y confirmar la actividad *cis*-*trans*-ndd de la misma.
- Determinar si en los sitios donde se almacenan los HPAs, también se realiza la activación de los mismos.

Para lograr los objetivos anteriores, se propone seguir los pasos propuestos en los esquemas de la Figura 40.

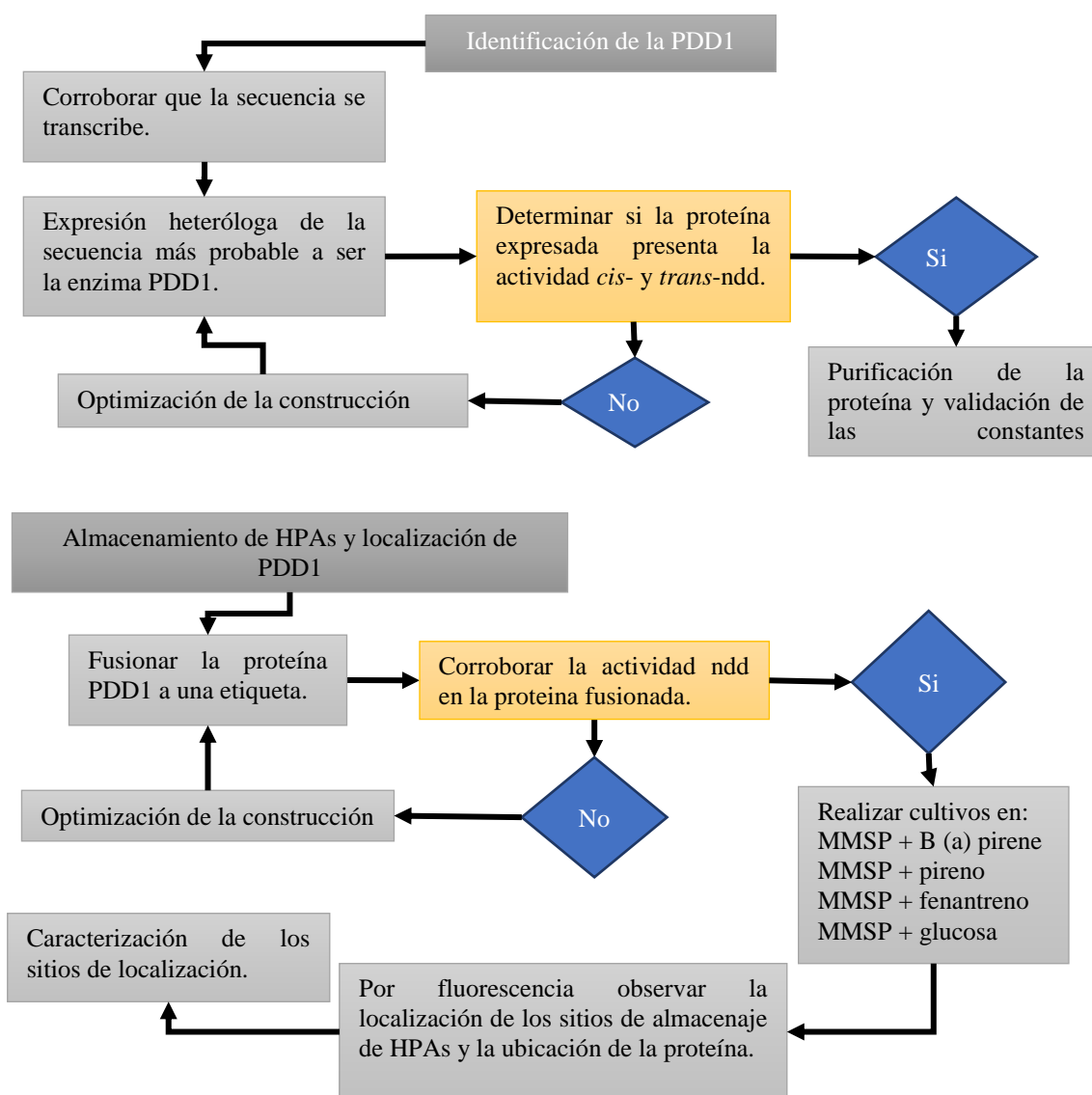


Figura 40. Esquema propuesto para cubrir las perspectivas.

# Apéndice I

---

## Determinación de la velocidad de reacción

La velocidad de una reacción está determinada por la cantidad de sustancia que es transformada por unidad de tiempo, lo cual puede ser expresado como:

$$v = \Delta AE \quad (\text{I.1})$$

donde  $v$ : velocidad de la reacción y  $AE$ : actividad enzimática específica.

Ya que, por definición, se sabe que la actividad enzimática específica es la medida de la cantidad de enzima presente y la cantidad de sustrato transformado por unidad de tiempo, en conjunto con la expresión (I.1) puede ser expresado como:

$$v = \Delta AE = \frac{\Delta \text{Cantidad de producto}}{\Delta \text{Unidad de tiempo} * \text{Proteína}} = \frac{\Delta c}{\Delta t P} \quad (\text{I.2})$$

Para conocer la cantidad de producto formado se efectúa el análisis espectrofotométrico de la actividad y se recurre a la ley de Lambert-Beer, que relaciona la absorción de luz con las propiedades del material atravesado, es decir:

$$A = \epsilon dc \quad (3)$$

donde  $A$ : absorbancia;  $\epsilon$ : coeficiente de extinción molar del NADP =  $6.22 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;  $d$ : distancia y  $c$ : concentración del analito.

Dado que la distancia de las celdas en los espectrofotómetros ha sido estandarizada a 1 cm,  $\epsilon \cdot d$  es un valor constante que puede expresarse como  $k = 6.22 \times 10^3 \text{ mol}^{-1}$

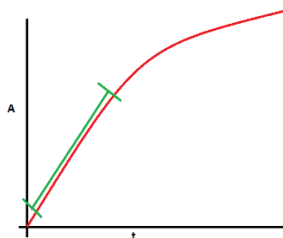
De la expresión (I.3), al despejar  $c$  y sustituir  $k$ , se obtiene:

$$c = \frac{A}{k} \quad (\text{I.3.1})$$

De la sustitución de (I.3.1) en la ecuación (I.2), se tiene:

$$v = \frac{\Delta c}{\Delta t P} = \frac{\Delta A}{k \Delta t P} \quad (\text{I.4})$$

Al medir la progresión de la reducción de NADP, en el espectrofotómetro, se genera un gráfico en el que se relaciona la absorbancia de la muestra con el tiempo de reacción:



La expresión:

$$A = mt + b \quad (\text{I.5})$$

donde  $m$ : pendiente de la recta y  $b$ : ordenada al origen; describe la velocidad de la reacción, en las etapas iniciales cuando el sistema se encuentra en óptimas condiciones, de aquí se puede despejar  $m$ , resultando:

$$m = \frac{A+b}{t} \quad (\text{I.5.1})$$

dado que al inicio de la reacción la cantidad de producto formado es 0

$$m = \frac{A}{t} \quad (\text{I.5.2})$$

Integrando (I.5.2) en (I.4), se tiene que para el cálculo de actividad:

$$v = \frac{\Delta A}{k\Delta tP} = \frac{m}{kP} \quad (\text{I.6})$$

ya que el valor de  $m$  está definido en función del incremento en la absorbancia a lo largo de un lapso de tiempo.

## Apéndice II

### Determinación de las constantes cinéticas del *trans*-naftalendiol

Después de realizar los cálculos de velocidad de reacción con distintas concentraciones del sustrato, y descartar los valores extremos y aquellos que no cumplieran con el criterio de pureza establecido, se calculó el promedio de velocidad para cada concentración de sustrato (Tabla II.1), estos datos presentaron un comportamiento Michaeliano por lo que la determinación de  $K_m$  y  $V_{max}$  se realizaron siguiendo ese modelo.

[ <i>trans</i> -naftalendiol] (mM)	$v$ (mmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> de proteína)
0.36	0.34 ± 0.10
0.72	0.59 ± 0.10
1.44	0.94 ± 0.13
1.8	1.35 ± 0.35
2.88	1.52 ± 0.08
3	2.46 ± 0.37
6	2.61 ± 1.12
9	4.14 ± 0.69
15	4.73 ± 0.30
18	5.20 ± 1.00
19	4.81 ± 0.10
21	4.82 ± 1.77

Tabla II.1. Valores promedio de velocidad de reacción con el sustrato *trans*-naftalendiol a una concentración constante de NADP.

La ecuación de Michaelis-Menten es fundamental en cinética enzimática, fue derivada de una reacción irreversible en la que se convertía un sustrato en un producto. La progresión de la reacción puede expresarse como:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (\text{II.1})$$

Los valores mostrados en la Tabla II.1 se ajustaron a modelos lineales para obtener la  $K_m$  y  $V_{max}$ . Con los datos de la Tabla II.2, se construyeron los gráficos mostrados en la Figura 15 de la sección 6.1.4.1. Se usaron tres modelos para la determinación de las constantes  $K_m$  y  $V_{max}$ , Linweaver-Burk, Eadie-Hofstee y Hanes.

[S]	V	[S]/v	v/[S]	1/[S]	1/v
0.36	0.34	1.06	0.94	2.78	2.96
0.72	0.59	1.21	0.82	1.39	1.69
1.44	0.94	1.54	0.65	0.69	1.07

1.8	1.35	1.33	0.75	0.56	0.74
2.88	1.52	1.90	0.53	0.35	0.66
3	2.46	1.22	0.82	0.33	0.41
6	2.61	2.30	0.43	0.17	0.38
9	4.14	2.17	0.46	0.11	0.24
15	4.73	3.17	0.32	0.07	0.21
18	5.20	3.46	0.29	0.06	0.19
19	4.81	3.95	0.25	0.05	0.21
21	4.82	4.36	0.23	0.05	0.21

Tabla II.2. Valores usados para el ajuste a modelos lineales.

El método de dobles recíprocos de Linweaver-Burk utiliza una transformación de la ecuación de Michaelis-Menten (II.1), invirtiendo ambos términos de la ecuación se obtiene

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}[S]} \quad (\text{II.2})$$

y, a partir de esta expresión, realizando el análisis de correlación lineal con los datos de la Tabla II.2, se obtuvo la ecuación

$$y = 1.0271x + 0.182 \quad (\text{II.3})$$

con un  $R^2 = 0.99$ . De igual forma, se aplicó el modelo Eadie-Hofstee en el que se hace uso de la ecuación

$$v = -K_m \frac{v}{[S]} + V_{max} \quad (\text{II.4})$$

y de la cual se obtuvo la ecuación

$$y = -6.6209x + 6.3762 \quad (\text{II.5})$$

con un  $R^2 = 0.87$ . Finalmente, el análisis con el modelo Hanes, dado por la ecuación

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{v_{max}} [S] + \frac{K_m}{v_{max}} \quad (\text{II.6})$$

se obtuvo la ecuación

$$y = 6.7222x - 7.3157 \quad (\text{II.7})$$

con  $R^2 = 0.95$ .

Mediante (II.3), (II.5) y (II.7) se obtuvieron los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$ . Para las constantes reportadas en la Tabla 4, se calculó el promedio de las obtenidas por los distintos métodos, incluyendo las generadas con el software GraphPad Prism.

## Apéndice III

### Determinación de las constantes cinéticas del NADP

Se calcularon las constantes cinéticas para el NADP cuando se usa *cis*-naftalendiol como segundo sustrato, así como para el *trans*-naftalendiol. Aunque en esta sección se muestran los cálculos realizados para el sustrato en conformación *cis*, se realizó el mismo procedimiento para el sustrato *trans*.

[NADP] (mM)	$v$ (mmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> de proteína)	$v^{0.12}$
3	0.19 ± 0.31	0.82
5	0.40 ± 0.19	0.90
6	1.19 ± 0.49	1.02
8	1.36 ± 0.24	1.04
10	1.28 ± 0.03	1.03
12	1.65 ± 0.58	1.06
15	3.62 ± 1.30	1.17
18	3.26 ± 1.15	1.15
24	4.97 ± 0.41	1.21
30	4.01 ± 0.46	1.18
35	3.74 ± 1.00	1.17

Tabla III.1. Valores promedio de velocidad de reacción con el sustrato NADP a una concentración constante de 19mM de *cis*-naftalendiol.

Ya que valores de velocidad no se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten, para poder calcular la  $V_{max}$  mediante los modelos lineales, cada valor se elevó a 0.12 ya que con esta potencia se obtenía el mejor ajuste a los modelos lineales (Tabla III.1). Una vez ajustados los datos al modelo Michaelis-Menten se calculó la  $V_{max}$  mediante las ecuaciones (II.2), (II.4) y (II.6).

Para el cálculo de la  $K_{app}$  se usó la gráfica de Hill descrita por la ecuación

$$\log \left[ \frac{Y}{1-Y} \right] = h \log[S] - \log K \quad (\text{III.1})$$

donde  $Y$  indica la fracción de ligando unido por sitio de unión. El valor  $h$  se conoce como número de Hill y es una medida de la cooperatividad, para  $h = 1$  no hay cooperatividad,  $h > 1$  hay cooperatividad positiva y para  $h < 1$  hay cooperatividad negativa. El término  $Y$  puede ser remplazado por  $v$ , obteniendo así:

$$\log \frac{v}{V_{max}-v} = h \log[S] - \log K \quad (\text{III.2})$$

Aplicando la ecuación a los datos experimentales se obtuvo el valor de  $h$  y  $K_{app}$ .

Aunque  $h$  es un estimador de la cooperatividad de un sistema, Koshland y col. (1966) han sugerido el uso de un índice ( $R_s$ ) como medida de cooperatividad donde

$$R_s = \frac{[S] \text{ a } 90\% \text{ de saturación}}{[S] \text{ a } 10\% \text{ de saturación}} \quad (\text{III.3})$$

Para una hipérbola rectangular, que no describe cooperatividad,  $R_s$  será igual a 81 y en el caso de cooperatividad positiva y negativa será menor o mayor a 81, respectivamente. La relación entre  $R_s$  y la constante de Hill, está dada por

$$R_s = \sqrt[h]{81} \quad (\text{III.4})$$

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- ⚙ Abdel-Shafy, H. y M. Mansour. 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*. 25: 107–123.
- ⚙ Acker MG, Auld DS. 2014. Considerations for the design and reporting of enzyme assays in high-throughput screening applications. *Perspectives in Science*. Vol. 1, 1: 56-73.
- ⚙ Alvarado-Caudillo, Y. 2007. Estudios moleculares de una Alcohol Oxidasa de la cepa YR-1 nativa de un suelo contaminado con hidrocarburos. Tesis (Doctorado en Ciencias). Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México.
- ⚙ Aoki, S., Ishikura, S., Asada, Y., Usami, N. y A. Hara. 2001. Identity of dimeric dihydrodiol dehydrogenase as NADP (+)-dependent D-xylose dehydrogenase in pig liver. *Chem Biol Interact*. 130-132 (1-3): 775-784.
- ⚙ Arboledas Brihuega D. 2011. Jerarquía estructural de las proteínas. Club Universitario. España. 186 pp
- ⚙ Arimitsu, E., Aoki, S., Ishikura, S., Nakanishi, K., Matsuura, K. y A. Hara. 1999. Cloning and sequencing of the cDNA species for mammalian dimeric dihydrodiol dehydrogenases. *Biochem J*. 342 (Pt 3): 721-728.
- ⚙ Asada. Y., Aoki, S., Ishikura, S., Usami, N. y A. Hara. 2000. Roles of His-79 and Tyr-180 of D-xylose/dihydrodiol dehydrogenase in catalytic function. *Biochem Biophys Res Commun*. 278 (2): 333-7.
- ⚙ Atlas, R. M. y T. C. Hazen. 2011. Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in U. S. history. *Environ. Sci. Technol*. 45: 6709- 6715.
- ⚙ Ayengar, P., Hayaishi, O., Nakajima, M. y I. Tomida. 1959. Enzymic aromatization of 3,5-cyclohexadiene-1,2-diol. *Biochim Biophys Acta*. 33 (1): 111-119.
- ⚙ Bartnicki-Garcia, S. y W. J. Nickerson. 1962. Nutrition, growth, and morphogenesis of *Mucor rouxii*. *J. Bacteriol*. 84 (4): 841.
- ⚙ Bezalel, L., Hadar, Y. y C. E. Cerniglia. 1997. Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol*. 63 (7): 2495–2501.
- ⚙ Binns D, Dimmer E, Huntley R, Barrell D, O'Donovan C, Apweiler R. 2009. QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching. [En línea]. *Bioinformatics*. 25 (22): 3045-6. [Fecha de consulta: 26 de mayo de 2017]. Disponible en < <http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GSearch?q=Enolase> >
- ⚙ Bisswanger, H. 2008. *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*. WILEY-VCH. Alemania.



- ✿✿ Camacho, R. L. 2012. Purificación, caracterización y localización intracelular de la enzima dihidrodiol-deshidrogenasa (DD) NADP-dependiente, en la cepa YR-1 de *Mucor circinelloides*. Tesis (Doctor en Ciencias). Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México.
- ✿✿ Camacho, R. L., Zazueta-Novoa, V., Leal, C., Flores, A., Ponce, P. y R. Zazueta-Sandoval. 2012. Polyacrylamide gel electrophoresis an important tool for the detection and analysis of enzymatic activities by electrophoretic zymograms. En: S. Magdeldin. Gel Electrophoresis-Advanced Techniques. InTech. Croacia. 247-264.
- ✿✿ Camacho, R. L., Zazueta-Novoa, V., González, J., Aranda, E., Ocampo, J. y R. Zazueta-Sandoval. 2014. Purification and characteristics of an inducible by polycyclic aromatic hydrocarbons NADP+-dependent naphthalenediol dehydrogenase (NDD) in *Mucor circinelloides* YR-1. Protein Expression and Purification. 97: 1-8.
- ✿✿ Cao J., Lai Q., Yuan J. and Z. Shaoa. 2015. Genomic and metabolic analysis of fluoranthene degradation pathway in *Celeribacter indicus* P73T. Sci Rep. 5: 7741
- ✿✿ Carvalho AK, da Conceição LR, Silva JP, Perez VH, de Castro HF. 2017. Biodiesel production from *Mucor circinelloides* using ethanol and heteropolyacid in one and two-step transesterification. Fuel. 202: 503-511
- ✿✿ Carbone, V., Endo, S., Sumii, R., Chung, R. P., Matsunaga, T., Hara, A. y O. El-Kabbani. 2008. Structures of dimeric dihydrodiol dehydrogenase apoenzyme and inhibitor complex: probing the subunit interface with site-directed mutagenesis. Proteins. 70 (1): 176-187.
- ✿✿ Casillas RP, Crow SA, Heinze TM, Deck J, Cerniglia CE. 1996. Initial oxidative and subsequent conjugative metabolites produced during the metabolism of phenanthrene by fungi. J Ind Microbiol. 16 (4): 205-15.
- ✿✿ Cerniglia, C., Morgan, J., y D. Gibson. 1979. Bacterial and fungal oxidation of dibenzofuran. Biochem. J. 180: 175-185.
- ✿✿ Cerniglia, C. y S. Yang. 1984. Stereoselective metabolism of anthracene and phenanthrene by the fungus *Cunninghamella elegans*. Appl. Environ. Microbiol. 1 (47): 119-124.
- ✿✿ Cerniglia, C. E. 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. J Ind Microbiol Biotechnol. 19: 324-333.
- ✿✿ Chrambach, A., Rodbard, D. 1971 Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Science 172: 440-451.
- ✿✿ Chauhan JS1, Rao A, Raghava GP. 2013. GlycoEP. [En línea]. In silico platform for prediction of N-, O- and C-glycosites in eukaryotic protein sequences. PLoS One. 8 (6): e67008. [Fecha de consulta: 25 de mayo de 2017]. Disponible en < <http://www.imtech.res.in/raghava/glycoep/> >

- ✿ Cortés, G. U. 2012. Análisis de las actividades de las *trans*-dihidrodiol deshidrogenasa presentes en *Mucor circinelloides* cepa YR-1. Tesis (Maestro en Ciencias). Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México.
- ✿ Crichton P, Affourtit C, and A L Moore. 2007. Identification of a mitochondrial alcohol dehydrogenase in *Schizosaccharomyces pombe*: new insights into energy metabolism. *Biochem J.* 401(Pt 2): 459–464.
- ✿ Das, N. y P. Chandran. 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International.*
- ✿ De Castro E, Sigrist CJA, Gattiker A, Bulliard V, Langendijk-Genevaux PS, Gasteiger E, Bairoch A, Hulo N. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jul 1; 34 (Web Server issue): W362-5
- ✿ Dixon, S. y E. Webb. 1979. *Enzymes.* Longman Group Limited. Londres.
- ✿ Durón, A. 2012. Estudio de las actividades enzimáticas oxido-reductasas y transglutaminasa en un hongo biodegradador de hidrocarburos. Tesis (Licenciado en Químico Farmacéutico Biólogo). Universidad de Guanajuato. Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México.
- ✿ Dym O. y D. Eisenberg. 2001. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci.* 10 (9): 1712–1728.
- ✿ Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2007. TargetP 1.1. [En línea]. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc.* 2 (4): 953-71. [Fecha de consulta: 25 de mayo 2017]. Disponible en < <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/> >
- ✿ Encyclopedia of life. EOL. Abril 2013. <http://eol.org/pages/988420/names>
- ✿ Fayeulle, A., Veignie, E., Slomianny, C., Dewailly, E., Munch, J. y C. Rafin. 2014. Energy-dependent uptake of benzo[a]pyrene and its cytoskeleton-dependent intracellular transport by the telluric fungus *Fusarium solani*. *Environ Sci Pollut Res Int.* 21 (5): 3515-3523.
- ✿ Farazi, T. A. 2001. The Biology and Enzymology of Protein N-Myristoylation. *Journal of Biological Chemistry.* 276 (43): 39501–39504.
- ✿ Fernández-Pérez, J. A. y J. E. Martínez. 2000. *Bioteconología del azafrán.* Univ de Castilla La Mancha. España.
- ✿ Fersht, A. 1980. *Estructura y mecanismo de los enzimas.* Reverté. España.
- ✿ Furuno, S., Foss, S., Wild, E., Jones, K. C., Semple, K. T., Harms, H. y L. Y. Wick. 2012. Mycelia promote active transport and spatial dispersion of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* 46: 5463–5470.
- ✿ Fukui, S., Tanaka, A., Kawamoto, S., Yasuhara, S., Teranishi, Y. y M. Osumi. 1975. Ultrastructure of metanol-utilizing yeast cells: appearance of microbodies in relation to high catalase activity. *J. Bacteriol.* 123: 317-328.

- ⚙ Geertz-Hansen HM, Blom N, Feist AM, Brunak S, Petersen TN. 2014. Cofactory v.1.0. [En línea]. Cofactory: Sequence-based prediction of co-sustrato specificity of Rossmann folds. Proteins. [Fecha de consulta: 25 de mayo 2017]. Disponible en < <http://www.cbs.dtu.dk/services/Cofactory/> >
- ⚙ Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T. K. y Y. Ahn. 2016. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A Review. *Frontiers in Microbiology*. 7: 1369.
- ⚙ Golemis, E. 2002. Protein-protein interactions: A molecular cloning manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- ⚙ González, J. L. 2013. Purificación y caracterización parcial de una trans-dihidrodiol deshidrogenasa inducible por fenantreno en *Mucor circinelloides* cepa YR-1. Tesis (Maestro en Ciencias). Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México.
- ⚙ Goyal, A. K. y G. J. Zylstra. 1996. Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. *Appl Environ Microbiol*: 62 (1): 230-236.
- ⚙ Gratz, S., Mohrhaus, A., Gamble, B., Gracie, J., Jackson, D., Roetting, J., Ciolino, L., McCauley, H., Schneider, G., Crockett, D., Krol, W., Arsenault, T., White, J., Flottmeyer, M., Johnson, Y., Heitkemper, D. y F. Fricke. 2010. Screen for the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons in select seafoods using lc-fluorescence. [En línea]. U.S. Food and Drug Administration. [consulta: 23 de noviembre 2016]. Disponible en < <http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/UCM220209.pdf> >
- ⚙ Johnson LS, SR Eddy, E Portugaly. 2010. Hidden Markov model speed heuristic and iterative HMM search procedure. *BMC Bioinformatics*. 11: 431.
- ⚙ K E Hammel. 1995. Mechanisms for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by ligninolytic fungi. *Environ Health Perspect*. 103 (Suppl 5): 41–43.
- ⚙ Hammes, G. G. y F. G. Walz Jr. 1969. Relaxation spectra of ribonuclease. VI. Interaction of ribonuclease with uridine 3'-monophosphate. *J. Am. Chem. Soc.* 91 (25): 7179–7186.
- ⚙ Han, M., Choi, H. y H. Song. 2004. Degradation of phenanthrene by *Trametes versicolor* and its laccase. *The Journal of Microbiology*. 42 (2): 94-98.
- ⚙ Hara, A., Shinoda, M., Kanazu, T., Nakayama, T., Deyashiki, Y. y H. Sawada. 1991. Inhibition of dimeric dihydrodiol dehydrogenases of rabbit and pig lens by ascorbic acid. *Biochem J*. 275 (Pt 1):121-126.
- ⚙ Hara, A., Matsuura, K., Tamada, Y., Sato, K., Miyabe, Y., Deyashiki, Y. y N. Ishida. 1996. Relationship of human liver dihydrodiol dehydrogenases to hepatic bile-acid-binding protein and an oxidoreductase of human colon cells. *Biochem J*. 15; 313 (Pt 2): 373-376.

- ✿ Haritash, A. K. y C. P. Kaushik. 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*. 169: 1-15.
- ✿ Hashim O. H. y N. A. Adnan. 1994. Coenzyme, cofactor and prosthetic group — Ambiguous biochemical jargon. *Biochemical Education*. 22: 93-94
- ✿ Hernández-Estrada, M., García-Gil, F., Hurtado-Sil, G., Lanz-Mendoza, H., Rodríguez, M. y F. Hernández. 2007. Regulación por Dexametasona y Ácido Araquidónico sobre la expresión de una Aldoceto Reductasa/Di-hidrodiol Deshidrogenasa (DDH) en estómagos del mosquito *Aedes aegypti*, principal vector del dengue en México. *Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar*. 6.
- ✿ Higaki, Y., Kamiya, T., Usami, N., Shintani, S., Shiraishi, H., Ishikura, S., Yamamoto, I. y A. Hara. 2002. Molecular characterization of two monkey dihydrodiol dehydrogenases. *Drug Metab Pharmacokinet*. 17 (4): 348-356.
- ✿ Hill, A.V. 1910. The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol*. 40: iv-vii.
- ✿ Hopkins, R. P. 1968. Microsomal ring-fission of *cis*- and *trans*-acenaphthene-1,2-diol *Biochem. J*. 108-577-582
- ✿ Howes, J.F. y W. H. Hunter. 1968. The metabolism of some 4-acetyl-1-naphthyl ethers in the rat and their effect upon liver microsomal oxidation. *Biochem Pharmacol*. 17 (8): 1655-1661.
- ✿ Hylland K. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. *J Toxicol Environ Health A*. 69 (1-2): 109-23.
- ✿ Hyunok Choi, Roy Harrison, Hannu Komulainen, Juana M. Delgado Saborit. 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons En: WHO guidelines for indoor air quality: selected pollutants. World Health Organization. Dinamarca. 289-345.
- ✿ Jacobs MH, Van den Wijngaard AJ, Pentenga M, Janssen DB. 1991. Characterization of the epoxide hydrolase from an epichlorohydrin-degrading *Pseudomonas* sp. *Eur J Biochem*. 202 (3): 1217-22.
- ✿ Joo ,W.A. y D. W. Speicher. 2007. Protein detection in gels without fixation. En: *Current Protocols in Protein Science*. John Wiley & Sons.
- ✿ Jouanneau, Y. y C. Meyer. 2006. Purification and characterization of an arene *cis*-dihydrodiol dehydrogenase endowed with broad substrate specificity toward polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiols. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (7): 4726-4734.
- ✿ Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. 2015. Phyre2 [En línea]. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*. 10 (6): 845-58. Fecha de consulta [6 de julio de 2017]. Disponible en <<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>>

- ✿ Kelly, V., Ireland, L., Ellis, E. y J. D. Hayes. 2000. Purification from rat liver of a novel constitutively expressed member of the aldo-keto reductase 7 family that is widely distributed in extrahepatic tissues. *Biochem. J.* 348: 389-400.
- ✿ Kim, S.J.; Jones, R.C.; Cha, C.J.; Kweon, O.; Edmondson, R.D.; Cerniglia, C.E. 2004. Identification of proteins induced by polycyclic aromatic hydrocarbon in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and de novo sequencing methods. *Proteomics.* 4: 3899-3908
- ✿ Kim, S. J., Kweon, O., Jones, R. C., Freeman, J. P., Edmondson, R. D. y C. E. Cerniglia. 2007. Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology. *J Bacteriol.* 189 (2): 464-472.
- ✿ King BR, Guda C. 2007. ngLOC: an n-gram-based Bayesian method for estimating the subcellular proteomes of eukaryotes. *Genome biology.* 8 (5): R68.
- ✿ Koshland DE Jr, Némethy G, Filmer D. 1966. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry.* 5(1): 365-385.
- ✿ Kumar, S., Singh, S.K., Kole, P.L., Elmarakby, S. y H. C. Sikka. 1995. Stereoselective metabolism of dibenz[a,h]acridine to bay-region diol epoxides by rat liver microsomes. *Carcinogenesis.* 16 (3): 525-530.
- ✿ Laborde, A. y D. Gibson. 1977. Metabolism of dibenzothiophene by a *Beijerinckia* species. *Applied and environmental microbiology.* 34 (6): 783-790.
- ✿ Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- ✿ Li C.H., Cervantes, M., Springer, D.J., Boekhout, T., Ruiz-Vazquez, R.M., Torres-Martinez, S.R., Heitman J. y S. C.Lee. 2011. Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog.* 7 (6).
- ✿ Liang, Y., Gardner, D., Miller, C., Chen, D., Anderson, A., Weimer, B. y R. Sims. 2006. Study of biochemical pathways and enzymes involved in pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. strain KMS. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (12): 7821-7828.
- ✿ Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. y R. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193 (1): 265-275.
- ✿ Mahely, A. C. y B. Chance. 1954. The assay of catalases and peroxidases. *Methods Biochem Anal.* 1: 357-424.
- ✿ Mildvan AS, Scrutton MC. 1967. Pyruvate carboxylase. X. The demonstration of direct coordination of pyruvate and alpha-ketobutyrate by the bound manganese and the formation of enzyme-metal-substrate bridge complexes. *Biochemistry.* 6 (10): 2978-2994.
- ✿ Joint Genome Institute. 2016. *Mucor circinelloides* CBS277.49 v2.0. [En línea]. The Genome Portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. [Fecha de

- consulta: 19 de abril de 2017]. Disponible en: < <http://genome.jgi-psf.org/Mucci1/Mucci1.home.html> >
- ✿ Nagao, K., Takizawa, N. y H. Kiyohara. 1988. Purification and properties of *cis*-phenanthrene dihydrodiol dehydrogenase in *Alcaligenes faecalis* AFK2. *Agric. Biol. Chem.* 52: 2621-2623.
  - ✿ National Center for Biotechnology Information. [En línea]. NCBI. [Fecha de consulta: 19 de abril de 2017]. Disponible en < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=36080&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> >
  - ✿ Neff JM. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the ocean. In: Neff JM. *Bioaccumulation in Marine Organisms*. Oxford: Elsevier. 241–318.
  - ✿ Nikolova, P. y O. Ward. 1991. Production of L-phenylacetyl carbinol by biotransformation: product and by-product formation and activities of the key enzymes in wild-type and ADH isoenzyme mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng.* 38 (5): 493-498.
  - ✿ Osset, M., Piño, M., Fallon, M. J., de Llorens, R. y C. M. Cuchillo. 1989. Interference of the carbohydrate moiety in coomassie brilliant blue R-250 protein staining. *Electrophoresis.* 10 (4): 271-273.
  - ✿ Packer N., Ball M., Devine P. y W. F. Patton. 2002. Detection of Glycoproteins in Gels and Blots. En: *Protein Protocols*. Humana Press. USA. 761-772
  - ✿ Sandoval. 2012. Polyacrylamide gel electrophoresis an important tool for the detection and analysis of enzymatic activities by electrophoretic zymograms. En: S. Magdeldin. *Gel Electrophoresis-Advanced Techniques*. InTech. Croacia. 247-264.
  - ✿ Pancholi V. 2001. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci.* 58 (7): 902-20.
  - ✿ Patel, T. R. y D. T. Gibson. 1974. Purification and properties of (+)-*cis*-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol.* 119 (3): 879-888.
  - ✿ Patel, T. R. y D. T. Gibson. 1976. Bacterial *cis*-dihydrodiol dehydrogenases: comparison of physicochemical and immunological properties. *J Bacteriol.* 128 (3): 842-850.
  - ✿ Papp T, Csernetics A, Nagy G, Bencsik O, Iturriaga EA, Eslava AP, Vágvölgyi C. 2013. Canthaxanthin production with modified *Mucor circinelloides* strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97 (11): 4937-50.
  - ✿ Peixoto, R. S., Vermelho, A. y A. S. Rosado. 2011. Petroleum-degrading enzymes: bioremediation and new prospects. *Enzyme Research*.
  - ✿ Peng, R.H., Xiong, A.S., Xue, Y., Fu, X., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.S. y Q. Yao. 2008 Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev.* 32 (6): 927-955.

- ✿ Penning, T., Burczynski, M., Hung, C., McCoull, K., Palackal, N. y L. Tsuruda. 1999. Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chem Res Toxicol.* 12 (1): 1-18.
- ✿ Quast U, Engel J, Heumann H, Krause G, Steffen E. 1974. Kinetics of the interaction of bovine pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz) with alpha-chymotrypsin. *Biochemistry.* 13 (12): 2512-2520.
- ✿ Reiner, A. M. 1972. Metabolism of aromatic compounds in bacteria. Purification and some properties of the catechol forming enzyme, 3,5-cyclohexadiene-1,2-diol-1-carboxylic acid (NAD<sup>+</sup>) oxidoreductase (decarboxylating). *J. Biol. Chem.* 247: 4960-4965.
- ✿ Rogers, J. E. y D. T. Gibson. 1977. Purification and properties of *cis*-toluene dihydrodiol dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol:* 130 (3): 1017-1024.
- ✿ Sato, K., Nakanishi, M., Deyashiki, Y., Hara, A., Matsuura, K. y I. Ohya. 1994. Purification and characterization of dimeric dihydrodiol dehydrogenase from dog liver. *J Biochem.* 116 (3): 711-717.
- ✿ Scott JE, Williams KP. Validating Identity, Mass Purity and Enzymatic Purity of Enzyme Preparations. 2012 May 1 [Updated 2012 Oct 1]. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing translational Sciences.
- ✿ Schwarz, F. y S. Wasik. 1976. Fluorescence measurements of benzene, naphthalene, anthracene, pyrene, fluoranthene, and benzo[a]pyrene in water. *Analytical Chemistry.* 48 (3): 524-528.
- ✿ Seo, J.S., Keum, Y.S. y Q. X. Li. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. *Int J Environ Res Public Health.* 6 (1): 278-309.
- ✿ Shore JD, Gutfreund H. 1970. transients in the reactions of liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry.* 9 (24): 4655-4659.
- ✿ Smith, J. J. y J. D. Aitchison. 2013. Peroxisomes take shape. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14 (12): 803-817.
- ✿ Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A. 1998. TMHMM Server v. 2.0. [En línea]. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.* 6: 175-82. Fecha de consulta [25 de mayo de 2017]. Disponible en < <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> >
- ✿ Sutherland, J. B. 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *J. Industrial Microbiology.* 9: 53-62.
- ✿ Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. 2015. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. [En línea]. *Nucleic Acids Res.* 43: D447-52. [Fecha de consulta: 06

de junio de 2017]. Disponible en < <http://version10.string-db.org/cgi/network.pl?taskId=VLexeL7UuLWW&sessionId=5pkgOvhKc2lX> >

- ⚙ Tabak, H., Chambers, C. y P. Kabler. 1964. Microbial metabolism of aromatic compounds I. Decomposition of phenolic compounds and aromatic hydrocarbons by phenol-adapted bacteria. *Journal of Bacteriology*. 87 (4): 910-919.
- ⚙ Tanaka, A., Osumi, M. y S. Fukui. 1982. Peroxisomes of alkane-grown yeast: Fundamental and practical aspects. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 386: 183-199.
- ⚙ Tauk-Tornisielo SM, Arasato LS, de Almeida AF, Govone JS, Malagutti EN. 2009. Lipid formation and  $\gamma$ -linolenic acid production by *Mucor circinelloides* and *Rhizopus* sp., grown on vegetable oil. *Braz J Microbiol.* 40 (2): 342-5.
- ⚙ Thieringer, R., Shio, H., Han, Y. S., Cohen, G. y P. B. Lazarow. 1991. Peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*: immunofluorescence analysis and import of catalase A into isolated peroxisomes. *Mol Cell Biol.* 11 (1): 510–522.
- ⚙ Towbin, H., Staehelin, T. y J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76 (9): 4350-4354.
- ⚙ Tyagi, R. K., Babu, B. R. y K. Datta. 1993, Simultaneous determination of native and subunit molecular weights of proteins by pore limit electrophoresis and restricted use of sodium dodecyl sulfate. *Electrophoresis.* 14: 826-828.
- ⚙ Twyman, R. M. 2014. Principles of proteomics. 2a ed. Garland Science.
- ⚙ U.S. Food and Drug Administration. 2012. Harmful and Potentially Harmful Constituents in Tobacco Products and Tobacco Smoke: Established List. FDA–2012–N–0143. USA.
- ⚙ Vallejo-Tinoco, V. O. 2007. Estudios moleculares del citocromo P-450 en la cepa YR-1 de *Mucor circinelloides*. Tesis (Licenciado). Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México.
- ⚙ Veenhuis, M., Sulter, G. J., van der Klei, I. J. y W. Harder. 1989. Evidence for functional heterogeneity among microbodies in yeast. *Arch. Microbiol.* 151: 105-110.
- ⚙ Verdin, A., Lounés-Hadj, A., Newsam, R., Robinson, G. y R. Durand. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environmental Pollution.* 133 (2): 283-291.
- ⚙ Visser, W., van Roermund, C., Ijlst, L., Waterham, H. R. y R. Wanders. 2007. Metabolite transport across the peroxisomal membrane. *Biochem J.* 401 (Pt 2): 365–375.
- ⚙ Vyas, K.P., Van Bladeren, P.J., Thakker, D.R., Yagi, H., Sayer, J.M., Levin, W. y D. M. Jerina. 1983. Regioselectivity and stereoselectivity in the metabolism of *trans*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrobenz[a]anthracene by rat liver microsomes. *Mol Pharmacol.* 24 (1): 115-123.



- ✿ Warshawsky D, Cody T, Radike M, Reilman R, Schumann B, LaDow K, Schneider J. 1995. Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. *Chem Biol Interact.* 97 (2): 131-48.
- ✿ Wass MN, Kelley LA, Sternberg MJ. 2010. 3DLigandSite [En línea]. 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures. *Nucleic Acids Res.* 38: 469-73. Fecha de consulta [5 de julio de 2017]. Disponible en < <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/3dligandsite/>>
- ✿ Werner, W. E. 1995. Ferguson plot analysis of high molecular weight glutenin subunits by capillary. Electrophoresis. *Cereal Chem.* 72 (3): 248-251.
- ✿ World Health Organization. 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbons, selected non-heterocyclic. [En línea]. IPCS INCHEM. Ginebra, Suiza. [Fecha de consulta: 2 de agosto de 2016]. Disponible en < <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm> >
- ✿ Zazueta-Sandoval, R., Zazueta-Nova, V., Silva-Jiménez, H. y R. Cabrera-Ortiz. 2003. A different method of measuring and detecting mono- and dioxygenases activities. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 105 (108): 725-736.
- ✿ Zazueta, R., Durón, A. y H. Silva. 2008. Peroxidases in YR-1 strain of *Mucor circinelloides* a potential bioremediator of petroleum-contaminated soils. *Annals of Microbiology.* 58: 199-204.