

00591



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y CINÉTICO
DE LA CATALASA-1 DE *Neurospora crassa*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
P R E S E N T A:
ADELAIDA DÍAZ VILCHIS

ASESOR: DR. WILHELM HANSBERG TORRES



MÉXICO, D. F.

FEBRERO 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Wilhelm Hansberg Torres en el laboratorio 103 oriente, en el departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Durante el proyecto doctoral Adelaida Díaz Vilchis recibió una beca-crédito del CONACyT con No. de registro 113969 y una beca complemento de la DGEP, UNAM.

To my dear Kurt Erlacher

A mis queridos padres: mi mami Joaquina Vilchis y a mi papi Romualdo Díaz por su apoyo, su cariño y motivación siempre.

Con mucho cariño a mis hermanos (as): Eduardo, José Alfredo, Amada, Juan Manuel, Mónica e Irene por confiar en mí, por ayudarme y estar conmigo en los momentos difíciles.

A mis adorables sobrinos (as): Citlali Malinalli, Eduardo Ehécatl, Indira Yuritzi, Ciuaxóchitl, Topiltzin, Saúl Yocoyani, Tania Celeste y Mariano, por todos los momentos divertidos e inolvidables que hemos pasado juntos.

Con mucho cariño a la memoria de mi prima Estela Díaz Rodea.

A mis mejores amigos (as): Hortensia Ahumada, Rebeca López, Leonardo Peraza, Floria Lizárraga, Víctor Julián Valdés, Viviana Zomoza, Lenin Domínguez, Paulina Cortés, Víctor Manuel Valdés, Lilián González, Atalo, Claudia Saavedra y Rita, por su maravillosa amistad.

A Violeta, Nancy, Reyna y Roberto.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Adelaida Oroz
Vilchis

FECHA: 4-junio-2004

FIRMA: [Firma]

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Wilhelm Hansberg Torres por confiar en mí, por todo su apoyo para la realización de mi proyecto, por las buenas discusiones de mis resultados y por darme la oportunidad de participar en el apasionante proyecto de la catalasa.

A mi comité tutorial de la maestría: Dra. Marietta Tuena de Gómez-Puyou, Dra. Rosario A. Muñoz Clares y Dr. Wilhelm Hansberg Torres.

A los integrantes del examen de candidatura: Dr. Eduardo Bárzana García (Presidente), Dr. Diego González Halphen, Dr. Eduardo Horjales Reboredo, Dr. Ruy Pérez Montfort, Dra. Rosario A. Muñoz Clares, Dra. Marietta Tuena de Gómez-Puyou y Dra. Adela Rodríguez Romero.

A mi comité tutorial del doctorado: Dra. Rosario A. Muñoz Clares, Dr. Eduardo Horjales Reboredo y Dr. Wilhelm Hansberg Torres.

A la Dra. Rosario A. Muñoz Clares por la asesoría en los experimentos de cinética enzimática que realicé durante mi proyecto.

Al Dr. Eduardo Horjales Reboredo por la asesoría en la determinación de la estructura de la catalasa-1 y por todo su apoyo en mi formación académica.

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, en especial a la Dra. Amelia Farrés González-Saravia y a la Dra. Rosario A. Muñoz Clares por todo el apoyo que me brindaron durante la maestría y el doctorado.

A los integrantes del tutorial ampliado: Dra. Rosario A. Muñoz Clares, Dra. Adela Rodríguez Romero, Dra. Marietta Tuena de Gómez-Puyou, Dr. Eduardo Horjales Reboredo y Dr. Wilhelm Hansberg Torres.

A los integrantes del jurado:

| | |
|------------|--|
| Presidente | Dr. Eduardo Horjales Reboredo |
| Vocal | Dr. Rafael Vázquez Duhalt |
| Vocal | Dra. Adela Rodríguez Romero |
| Vocal | Dr. Juan Pablo Pardo Velázquez |
| Secretario | Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco |
| Suplente | Dr. Diego González Halphen |
| Suplente | Dr. Rogelio Rodríguez Sotres |

Al Stanford Synchrotron Radiation Laboratory.

Dr. David Vargas de Bruker Mexicana, S. A. De C. V. por apoyarnos para la realización de un MALDI-TOF de la catalasa-1.

Al Dr. Horacio Reyes Vivas por su asesoría en los experimentos de la proteólisis de la catalasa-1.

A Enrique Rudiño Piñera y Rodrigo Arreola Alemón por su ayuda con los programas de Cristalografía.

Al CONACyT por otorgarme una beca-crédito para mi doctorado.

A la DGEP, UNAM por otorgarme una beca complemento para mi doctorado.

A los integrantes de la Unidad de Cómputo del IFC.

A Gloria Hernández, Horacio Reyes y Gabriel López por darme la oportunidad de colaborar con ellos y poner en práctica mis conocimientos de Cristalografía de Proteínas.

A mis compañeros del laboratorio: Leonardo Peraza, Mauricio Ríos, Víctor Julián Valdés, Pablo Rangel, Vanessa Vega, Aydé M. Oliva, Cristina Martínez, Daniel Silva, Yésika Montes de Oca, Fernando Lledías, Shaday Michán y Miguel Beltrán.

A mis alumnos (as): Daniel Silva, Cristina Martínez, Víctor Julián Valdés y Aydé M. Oliva, por todos los momentos emocionantes.

Un agradecimiento especial a Alejandro Flores.

A Leticia García y Adelina por su eficiente ayuda en todos los trámites que un estudiante de doctorado debe realizar.

A Jesús Aguirre y su grupo: Olivia Sánchez, Karen Álvarez, Teresa Lara, Gabriela Soid, Adriana Valera, Nallely Cano, Luis segura y José Luis Ramos.

A Lenin Domínguez, por ser mi amigo y por su invaluable ayuda con las computadoras y los programas.

A mis padres Joaquina Vilchis y Romualdo Díaz y a mis hermanos (as), en especial a Irene Díaz.

A Víctor Julián Valdés, por ser mi amigo y una persona a quién admiro y respeto mucho.

A Floria Lizárraga y Leonardo Peraza por ser mis amigos.

A mis amigas del alma: Hortensia Ahumada y Rebeca López.

A los compañeros y amigos vecinos: Gloria Hernández, Hugo Nájera, Gerardo Pérez, Gabriel Mercado, Ernesto Maldonado, Horacio Reyes, Viviana Zomosa, Alfredo Tellez, Marcela Varela, Nallely Cabrera, Vanessa, Jorge Ramírez, José Sanpedro, Lilián González, Rosa Navarro, Laura Kawasaki, los integrantes del laboratorio del Dr. Eduardo Horjales, compañeros del 101, 104 y 105 oriente entre otros.

A Floria Lizárraga y Leonardo Peraza por ser mis amigos.

A mis amigas del alma: Hortensia Ahumada y Rebeca López.

A los compañeros y amigos vecinos: Gloria Hernández, Hugo Nájera, Gerardo Pérez, Gabriel Mercado, Ernesto Maldonado, Horacio Reyes, Viviana Zomosa, Alfredo Tellez, Marcela Varela, Nallely Cabrera, Vanessa, Jorge Ramírez, José Sanpedro, Lilián González, Rosa Navarro, Laura Kawasaki, los integrantes del laboratorio del Dr. Eduardo Horjales, compañeros del 101, 104 y 105 oriente entre otros.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 1 |
| SUMMARY | 4 |
| ABREVIATURAS | 6 |
| INTRODUCCIÓN | 7 |
| Las especies de oxígeno reactivas | 7 |
| Enzimas que desechan el peróxido de hidrógeno | 8 |
| Importancia de las catalasas monofuncionales | 9 |
| Mecanismo de reacción de las catalasas | 10 |
| Diferencias entre las catalasas | 12 |
| La cinética de la reacción de catalasa | 15 |
| Estructura tridimensional de las catalasas | 16 |
| El grupo hemo y su función | 19 |
| La tensión oxidativa y su relación con la diferenciación celular en <i>N. crassa</i> | 21 |
| Las catalasas de <i>N. crassa</i> | 21 |
| OBJETIVOS | 22 |
| Objetivos generales | 22 |
| Objetivos particulares | 22 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 24 |
| MATERIALES | 24 |
| MÉTODOS | 24 |
| Cepas y condiciones de cultivo | 24 |
| Purificación de la CAT-1 | 24 |
| Determinación de la concentración de proteína | 24 |
| Entrecruzamiento con glutaraldehído y la determinación de la glicosilación de la proteína | 25 |
| Modificación de la CAT-1a en CAT-1e | 25 |
| Ensayos enzimáticos | 25 |
| Ensayos de estabilidad | 26 |
| Electroforesis en geles de poliacrilamida | 26 |
| Tratamiento con subtilisina | 26 |
| Dicroísmo circular | 26 |
| Fluorescencia de la proteína y del hemo | 27 |
| Cristalización y colecta de datos | 27 |
| Determinación de la estructura y afinamiento | 27 |
| Secuenciación del N-terminal | 28 |
| Espectrometría de masas | 28 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 29 |
| I Caracterización molecular y cinética de la CAT-1..... | 29 |
| a) Caracterización molecular | 29 |
| b) Caracterización cinética | 31 |

| | |
|---|----|
| II Comparación estructural y funcional de la CAT-1a con la CAT-1e | 33 |
| a) Comparación estructural | 33 |
| b) Comparación funcional | 39 |
| III La estructura cristalográfica de la CAT-1 | 43 |
| a) La determinación de la estructura | 43 |
| b) La estructura de la CAT-1 | 45 |
| c) El sitio activo y el hemo | 47 |
| d) Un enlace covalente inusual Cys-Tyr | 50 |
| e) Los canales de la CAT-1 y su posible función | 53 |
| DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS | 56 |
| a) Estabilidad | 56 |
| b) La CAT-1a y la CAT-1e | 56 |
| c) Posible función del dominio C-terminal | 56 |
| d) El enlace covalente Cys-Tyr y su posible relación con la resistencia al sustrato | 57 |
| e) Cinética compleja | 57 |
| f) Canales | 59 |
| g) Oxidación del hemo | 59 |
| h) La función biológica de la CAT-1 | 60 |
| CONCLUSIONES | 62 |
| REFERENCIAS | 65 |
| Anexo A) Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of <i>Neurospora crassa</i> . | |
| Anexo B) Functional and structure analysis of catalase oxidized by singlet oxygen. | |
| Anexo C) Unusual Cys-Tyr covalent bond in a large catalase. | |

RESUMEN

La catalasa es una enzima antioxidante fundamental que está presente en la mayoría de los organismos. Cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y dióxígeno. Las catalasas están relacionadas con la diferenciación en varios organismos (1-5). Durante la formación de las esporas asexuales (conidios) de *Neurospora crassa* hay un incremento en la actividad de la catalasa. Los conidios tienen 60 veces más actividad de catalasa que las hifas creciendo en un medio líquido (6-7).

La mayoría de las catalasas son homotetrámeros con un grupo hemo en cada subunidad. Algunas catalasas tienen subunidades pequeñas (masa molecular \approx 60 kDa) y otras grandes (masa molecular \approx 80 kDa). Entre estos dos tipos de catalasas existen diferencias estructurales y funcionales importantes.

La catalasa-1 (CAT-1) es una de las dos catalasas monofuncionales de *N. crassa* que tiene subunidades grandes. Está asociada con células que no crecen y se acumula en las esporas asexuales. La CAT-1 purificada se oxida en el hemo por el oxígeno singulete, originando enzimas activas con una diferente movilidad electroforética (8). La CAT-1 se modifica durante la diferenciación celular y en condiciones de tensión metabólica, condiciones en las que se genera oxígeno en singulete.

En esta tesis presento la caracterización molecular y cinética de la CAT-1, la comparación estructural y funcional de la CAT-1a (no oxidada) con la CAT-1e (completamente oxidada) y la estructura cristalográfica de la CAT-1.

La CAT-1 se purificó 170 veces a partir de cultivos conidiantes con un rendimiento del 48%. La CAT-1 es un homotetrámero con monómeros de 88 kDa que están glicosilados con α -glucosa y/o α -manosa. Esta enzima es más resistente que otras catalasas a la inactivación por calor, por una alta concentración de sal y por varios desnaturalizantes. Esta enzima es activa en un intervalo de pH de 4 a 12. La CAT-1 es resistente a concentraciones molares de sustrato y tiene una cinética compleja. La CAT-1 se inactiva con 3-amino-1,2,4-triazol, con azida y con hidroxilamina, y se inhibe competitivamente con cianuro. La cinética de saturación de la CAT-1 se ajustó a un modelo de dos componentes. Uno de los componentes está presente en bajas concentraciones de sustrato (<100 mM) y el otro se manifiesta en concentraciones altas de sustrato (>250 mM). Ambos componentes podrían presentar cooperatividad, con una cooperatividad mayor en el segundo componente.

Comparada con la CAT-1a, la CAT-1e presentó un valor mayor en sus $S_{0.5}$. Sin embargo, el valor de las V_{max} , las k_{cat} y la eficiencia catalítica fueron similares en ambas enzimas. La CAT-1e es más sensible a la inhibición con cianuro que la CAT-1a. Otros inhibidores no mostraron diferencias significativas entre estas enzimas. La CAT-1e es menos activa en un pH extremo y menos estable en pH ácido que la CAT-1a. La CAT-1a resultó más estable que la CAT-1e a la inactivación por calor, a concentraciones molares de clorhidrato de guanidina y a la degradación proteolítica con subtilisina. Los espectros de emisión de fluorescencia del hemo sugieren que hay un cambio estructural local cuando la CAT-1 se modifica por el oxígeno. No se encontraron grandes diferencias conformacionales entre las enzimas analizadas con el dicroísmo circular y la fluorescencia de la proteína. La CAT-1a y la CAT-1e no presentaron diferencias en sus energías de activación para la catálisis, lo cual indica que estas enzimas tienen una catálisis similar. De acuerdo con las evidencias anteriores, la CAT-1a y la CAT-1e tienen diferencias estructurales y cinéticas, pero las diferencias sólo se detectaron en condiciones extremas. En condiciones fisiológicas, ambas enzimas son funcionalmente equivalentes.

El cristal de la CAT-1 pertenece al grupo espacial C2 con un dímero en la unidad asimétrica. La estructura de la CAT-1 se determinó a 1.75 Å de resolución. Los valores de R_{cryst} y R_{free} fueron de 18.3 y de 20.6, respectivamente. La secuencia del extremo N-terminal de la CAT-1 no contiene los primeros 21 aminoácidos y en el cristal no se observan los siguientes 17. Las mayores diferencias entre la CAT-1 y las otras dos estructuras de catalasas grandes se encuentran en el dominio C-terminal.

Se propone un mecanismo que abre la parte estrecha del canal principal sólo cuando hay suficiente peróxido de hidrógeno en la cavidad pequeña antes de la parte estrecha. Este mecanismo de puerta explicaría el aumento en la actividad catalítica cuando se incrementa la concentración de sustrato. El hemo de la CAT-1 es una mezcla del Fe-protoporfirina IX (hemo *b*) con un hemo oxidado que tiene un *cis*-hidroxilo y una γ -espirolactona en el anillo pirrólico III, denominado hemo *d*. La proporción encontrada en el cristal de hemo *b* es de 57% y de hemo *d* de 43%. El oxígeno en singulete podría hidroxilar el C5 y el C6 del anillo pirrólico III y formar el hemo *d*. El sitio de modificación en las catalasas depende probablemente del camino que sigue el dioxígeno para salir de la proteína, en las catalasas grandes principalmente a través del canal central, mientras que en las catalasas pequeñas a

través del canal principal. La CAT-1 presenta un enlace covalente inusual entre el azufre de la Cys356 y el C β de la Tyr379 que coordina el Fe del hemo. Dicho enlace se confirmó por un análisis de espectrometría de masas de los péptidos de la CAT-1 obtenidos con tripsina. También se propone un mecanismo para la formación del enlace covalente Cys-Tyr. Una posible función del enlace covalente podría ser el evitar la formación de los compuestos inactivos, denominados compuesto II y compuesto III, que se producen en las catalasas pequeñas y explican la inhibición e inactivación con el sustrato en estas enzimas.

SUMMARY

Catalase, a fundamental antioxidant enzyme present in most organisms, dismutates hydrogen peroxide into water and oxygen. Catalases are related to development in various organisms (1-5). During the formation of spores (conidia) in the *Neurospora crassa* asexual life cycle there is a step-wise increase of catalase activity. Conidia have 60 times more catalase activity than hyphae growing in a liquid culture (6-7).

Most catalases are homotetramers with one heme group per subunit. They are composed of either small subunits (molecular mass \approx 60 kDa) or large subunits (molecular mass \approx 80 kDa). There are important structural and functional differences between small and large catalases.

Catalase-1 (CAT-1) is one of the two large monofunctional catalases of *N. crassa*. CAT-1 is associated with non-growing cells and accumulates in asexual spores. Purified CAT-1 is oxidized at the heme by singlet oxygen giving rise to active catalase enzymes with different electrophoretic mobility (8). CAT-1 is modified during cell differentiation and under stress conditions, in which singlet oxygen is generated.

In this thesis, I present a molecular and kinetic characterization of CAT-1, a comparison of structural and functional features in CAT-1a (non-oxidized), and CAT-1e (fully oxidized) and the crystallographic structure of CAT-1.

CAT-1 was purified 170-fold from conidiating cultures with a yield of 48%. CAT-1 is a homotetramer with 88 kDa monomers that are glycosylated with α -glucose and/or α -mannose. CAT-1 is more resistant than other catalases to heat inactivation, to high concentrations of salt and denaturants. It is fully active over a pH range between 4 and 12. CAT-1 is resistant to molar concentrations of substrate and has complex kinetics. It is inactivated by 3-amino-1,2,4-triazole, azide and hydroxylamine, and is competitively inhibited by cyanide. CAT-1 kinetics fits to a two-component model in which one component is present at low concentrations of substrate (<100 mM) and the other at high concentrations of substrate (>250 mM). Both components could be cooperative with a higher cooperativity for the second component.

Compared with CAT-1a, CAT-1e had a higher value of its $S_{0.5}$. However, V_{max} , k_{cat} and catalytic efficiency were similar in both enzymes. CAT-1e was more sensitive than CAT-1a to inhibition by cyanide. Other inhibitors assayed showed no significant

differences between these enzymes. CAT-1e was less active than CAT-1a at extreme pH and less stable in the acid pH. CAT-1a was more resistant than CAT-1e to heat inactivation, molar concentrations of guanidine hydrochloride and proteolysis with subtilisin. Heme fluorescence spectra suggest that there is a local structural change when CAT-1 is modified by oxygen. No significant conformational differences between enzymes were detected by circular dichroism and protein fluorescence. CAT-1a and CAT-1e had no differences on its activation energy for catalysis, indicating that these enzymes have a similar catalysis. Evidences presented indicate that CAT-1e is functionally and structurally different than CAT-1a, but these differences were only detected under extreme conditions. Under physiological conditions, both CAT-1 enzymes are functionally equivalent.

CAT-1 crystal belongs to the space group C2 with a dimer in the asymmetric unit. CAT-1 structure was determined at 1.75 Å resolution. The final R_{cryst} and R_{free} were 18.3 and 20.6, respectively. The N-terminal end sequence does not have the first 21 residues and in the crystal the next 17 residues were not observed. Main differences between CAT-1 and other two large catalase structures were observed in the C-terminal domain.

A mechanism is proposed in which the narrow part of the channel opens only when there is sufficient hydrogen peroxide in the small cavity before a gate. This mechanism would explain the increase in catalytic velocity when the substrate rises. CAT-1 structure has a mixture of Fe-protoporphyrin IX (heme *b*) (57%) and an oxidized heme (43%) with a *cis*-hydroxy γ -spirolactone in pyrrole ring III, denominated heme *d*. Singlet oxygen may hydroxylate C5 and C6 of this pyrrole ring to form heme *d*. The modification site probably depends on the way dioxygen exits the protein, which we propose to be through the central channel in large catalases. In contrast, in small catalases the main O₂ exit is through the main channel. CAT-1 has an unusual covalent bond between the Cys356 sulfur and the Tyr379 C β , the tyrosine that coordinates the iron of the heme. This covalent bond was confirmed by mass spectrometry analysis of CAT-1 trypsin peptides. A mechanism for the origin of the covalent bond is proposed. A possible function of this bond could be related to a reduced formation of the so-called compound II and III, which lead to an inactive enzyme in the catalase reaction.

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|---|
| BLC | catalasa de hígado de bovino |
| CAPS | ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico |
| CAT-1 | catalasa-1 de <i>Neurospora crassa</i> |
| CAT-1a | catalasa-1 de <i>N. crassa</i> no oxidada |
| CAT-1c | catalasa-1 de <i>N. crassa</i> parcialmente oxidada |
| CAT-1e | catalasa-1 de <i>N. crassa</i> completamente oxidada |
| CAT-2 | catalasa-2 (catalasa-peroxidasa) de <i>N. crassa</i> |
| CAT-3 | catalasa-3 de <i>N. crassa</i> |
| CAT-4 | catalasa-4 de <i>N. crassa</i> |
| CatF | catalasa de <i>Pseudomonas syringae</i> |
| CatR | catalasa R de <i>Aspergillus niger</i> |
| CCP4 | Collaborative Computational Project, No. 4 |
| CHES | ácido 2-(N-ciclohexilamino) etanosulfónico |
| CNS | Crystallography and NMR system |
| DDQ | Difference density quality |
| DMSO | dimetil sulfóxido |
| <i>Ea</i> | energía de activación |
| HEC | catalasa de eritrocitos humanos |
| HEPES | ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico |
| HPII | hidroperoxidasa II de <i>Escherichia coli</i> |
| MES | ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico |
| MLC | catalasa de <i>Micrococcus lysodeikticus</i> |
| n | número de Hill |
| NADPH | fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido |
| PAGE | electroforesis en gel de poliacrilamida |
| PMC | catalasa de <i>Proteus mirabilis</i> |
| PMSF | <i>p</i> -fenil metilsulfonilfluoruro |
| PVC | catalasa de <i>Penicillium vitale</i> |
| PVDF | polivinildifluorobenceno |
| R_{cryst} | Factor R cristalográfico |
| R_{free} | Factor R libre |
| SCCA | catalasa de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> |
| SDS | dodecil sulfato de sodio |
| SDS-PAGE | electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS |
| SOD | dismutasa del superóxido |

INTRODUCCIÓN

Las especies de oxígeno reactivas

Las especies de oxígeno reactivas se derivan del oxígeno y son más reactivas que el dióxigeno (O_2) en su estado basal. Las principales especies de oxígeno reactivas son: el oxígeno atómico (O) y el ozono (O_3), que se producen por la acción de la luz ultravioleta o las descargas eléctricas sobre el O_2 ; el oxígeno en singulete (1O_2), que es el oxígeno en una forma excitada; el superóxido ($O_2^{\bullet -}$), que es el O_2 que ha captado un electrón; el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que se forma cuando el superóxido capta otro electrón y se protona; el radical hidroxilo (HO^{\bullet}), que se genera cuando el H_2O_2 se rompe al captar un electrón y que tiene un electrón menos que el otro producto, el ión hidroxilo; el radical nitrosilo (NO^{\bullet}), que se forma por la acción de la óxido nítrico sintasa sobre el grupo guanidino de la arginina y, finalmente, el peroxinitrito ($OONO^-$), que es el producto de la reacción espontánea del radical nitrosilo con el superóxido (Fig. 1).

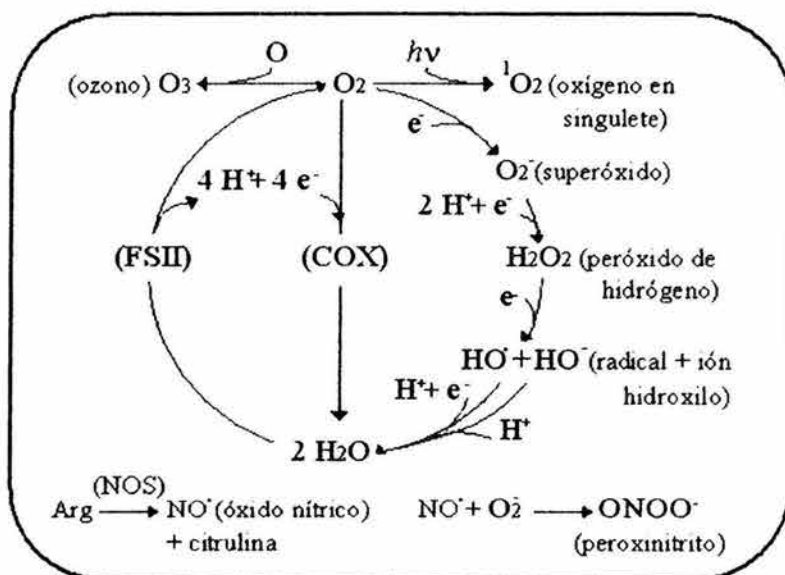


Fig.1.- Las principales especies de oxígeno reactivas. Las especies de oxígeno reactivas se generan por la ruptura o la excitación del dióxigeno (O , O_3 , 1O_2) o por la reducción parcial del mismo ($O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 , HO^{\bullet}). El fotosistema II (FSII) lleva a cabo la oxidación completa

del agua (oxígeno) en dióxigeno (fotosíntesis) mientras que la oxidasa del citocromo c (COX) efectúa la reducción completa del dióxigeno en agua (respiración). El radical nitrosilo (NO^{\bullet}) se produce por la acción de la óxido nítrico sintasa (NOS), en cambio, el peroxinitrito se produce de manera espontánea. $h\nu$ = energía de radiación. Esquema tomado de la Fig. 1 de la referencia 12.

Las especies de oxígeno reactivas pueden dañar las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos, por lo que se requieren sistemas antioxidantes eficientes, entre los que se incluyen las enzimas antioxidantes y los compuestos antioxidantes. Las superóxido dismutasas (SOD), las peroxirredoxinas, las peroxidasas y las catalasas son ejemplos de enzimas antioxidantes. El glutatión, el ascorbato (vitamina C), el α -tocoferol (vitamina E), el β -caroteno y el urato son los principales compuestos antioxidantes. Sin embargo, las especies de oxígeno reactivas no sólo son agentes de daño sino que también se utilizan como segundos mensajeros en las células para regular la proliferación, la diferenciación y la muerte celular (8-11).

La mayor parte del peróxido de hidrógeno se forma con la dismutación del radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) espontánea o por las superóxido dismutasas, y también como producto de la reacción de algunas oxidasas, sobre todo la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa.

Enzimas que desechan el peróxido de hidrógeno

Hay varias enzimas capaces de degradar el peróxido de hidrógeno: las peroxirredoxinas, las peroxidasas y las catalasas. Las peroxirredoxinas desechan el peróxido de hidrógeno a través de un sistema de oxidación/reducción de grupos tioles. Las peroxidasas requieren un sustrato reducido para desecharlo. La glutatión peroxidasa reduce los hidroperóxidos utilizando glutatión como agente reductor. Las hemoperoxidasas se pueden dividir en la superfamilia de los animales y la superfamilia de plantas, hongos y procariontes. Estas enzimas difieren entre sí en su estructura primaria, secundaria y terciaria por lo que se piensa que representan familias de genes diferentes. Las hemoperoxidasas de animales son proteínas mayores a 700 aminoácidos, tienen el hemo unido covalentemente y sitios para unir Ca^{2+} . Las hemoperoxidasas de plantas, hongos y procariontes no unen covalentemente el hemo y difieren de las hemoproteínas de animales en que éstas son proteínas de 300 aminoácidos. Las peroxidasas de hongos y las de plantas tienen dos calcio estructurales. Estos calcio están colocados axial y distalmente al grupo hemo. Estos son responsables de la estabilidad de la proteína y se pierden cuando se inactiva por temperatura. Esta superfamilia se divide en tres clases. La clase I incluye la citocromo *c* peroxidasa de *Saccharomyces cerevisiae*, las ascorbato peroxidasas de cianobacterias, las algas y las plantas, y las catalasas/peroxidasas. La clase II comprende las

peroxidasas extracelulares de los hongos, como las lignino peroxidasas y las manganeso peroxidasas. La clase III incluye las peroxidasas de secreción de las plantas, como la peroxidasa del rábano blanco.

Las enzimas menos eficientes son las peroxirredoxinas ($10^3 - 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y las más eficientes son las catalasas ($10^6 - 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Las primeras funcionan a concentraciones muy bajas de H_2O_2 ($<0.06 \text{ mM}$) y las segundas a concentraciones muy altas (20 - 600 mM). Las peroxidasas tienen una eficiencia intermedia y funcionan a concentraciones intermedias de H_2O_2 (12-14).

Hay tres grupos de enzimas con actividad de catalasa: i) las catalasas monofuncionales que son homotetrámeros, contienen hemo y están presentes tanto en los organismos procariontes como en los eucariontes, ii) las Mn-catalasas, que son enzimas hexaméricas que tienen Mn en el sitio activo y sólo están presentes en algunos organismos procariontes anaerobios y iii) las catalasas-peroxidasas, que son dímeros que contienen un hemo por subunidad, tienen actividad de catalasa y de peroxidasa y sólo están presentes en las bacterias y en los hongos (15).

Importancia de las catalasas monofuncionales

La eliminación del H_2O_2 evita que se forme el radical hidroxilo y el oxígeno singulete, especies de oxígeno que son muy reactivas. La mayoría de daños en las proteínas son ocasionados por el hidroxilo. El hidroxilo reacciona con cualquier aminoácido en el sitio donde se forma, que generalmente son sitios en donde se encuentra un metal de transición. Así, la glutamina sintetasa de *Neurospora crassa* y la glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH se inactivan cuando se oxidan por el hidroxilo. El oxígeno singulete es más selectivo y reacciona particularmente con los aminoácidos triptofano, tirosina, histidina, lisina, metionina y cisteína. El grado de oxidación de las proteínas de una célula se puede medir detectando los carbonilos en la proteína total. Los carbonilos se forman por la oxidación de la prolina y la arginina en semialdehído de glutamato y por rupturas de la cadena peptídica. Los daños producidos por el hidroxilo y el oxígeno singulete son irreversibles y en términos generales marcan las proteínas para su degradación. En los eucariontes, la mayoría de las proteínas oxidadas se degradan en el citosol y sólo algunas en los lisosomas. El reconocimiento de los sitios oxidados o

halogenados o la exposición de regiones hidrofóbicas determinan la ubiquitinación de las proteínas y su degradación en el proteasoma (12).

La mayoría de los organismos aerobios tienen catalasas monofuncionales, aunque algunos pocos no tienen, como las bacterias *Bacillus popilliae*, *Mycoplasma pneumoniae*, la cianobacteria *Gloeocapsa*, el protista *Euglena* y varios helmintos parásitos (13).

En el hombre, la catalasa protege a la hemoglobina del peróxido de hidrógeno que se genera en los eritrocitos (16). También tiene un papel de protección en la inflamación (17), en la prevención de mutaciones (18), retrasa el envejecimiento prematuro y cierto tipo de cáncer (19). Las mutaciones en el gen de la catalasa resultan en la enfermedad hereditaria denominada acatalasemia que, entre otros síntomas, se reconoce por un incremento en la incidencia de ulceraciones bucales (13).

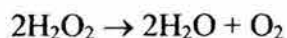
Muchas bacterias, hongos y plantas tienen varias catalasas que están reguladas de manera diferente (1, 20-24). Es interesante que las catalasas estén relacionadas con la diferenciación en varios organismos (1-5).

La catalasa se ha estudiado por más de un siglo. Sin embargo, hay muchas preguntas sobre la función y la estructura de las catalasas aún sin responder, como se verá más adelante. Por ejemplo, la función de la unión del NADPH en algunas catalasas pequeñas no está totalmente entendida. Las catalasas grandes, presentes únicamente en los hongos y las bacterias no unen NADPH, pero tienen un dominio en el extremo C-terminal semejante a la flavodoxina cuya función se desconoce. Las catalasas grandes son más resistentes a la inhibición e inactivación con el sustrato que las catalasas pequeñas y aún no se sabe el por qué de esta resistencia. Tampoco se tiene información de la función del enlace covalente His-Tyr de la catalasa HP11 de *Escherichia coli* ni de la diferente orientación del hemo en las catalasas grandes.

Mecanismo de reacción de las catalasas

La catalasa monofuncional (EC 1.11.1.6) degrada dos moléculas de peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua y una de dióxigeno como se resume en la reacción total (Reacción 1). En esta reacción ocurre la transferencia de dos electrones entre dos moléculas de peróxido de hidrógeno, una funciona como donador y otra como aceptor de electrones. El mecanismo de reacción se lleva a cabo en dos pasos. En el primero, la

catalasa se oxida por una molécula de peróxido de hidrógeno formando un intermediario llamado compuesto I. El compuesto I se caracteriza por tener un grupo ferroxilo ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) y un radical catiónico de porfirina. En el primer paso de la reacción se produce una molécula de agua (Reacción I de la Fig. 2). En el segundo paso de la reacción, el compuesto I es reducido por otra molécula de peróxido de hidrógeno regresando la catalasa a su estado inicial y produciendo una molécula de dióxígeno y otra de agua (Reacción II de la Fig. 2).



1

En ciertas condiciones el compuesto I puede captar un electrón proveniente de otra molécula reducida originando el compuesto II. En el compuesto II, el carácter del radical catiónico de porfirina se pierde (Reacción III de la Fig.2). Este intermediario, al reaccionar con una molécula de H_2O_2 , forma el compuesto III (Reacción IV de la Fig. 2) o, alternativamente, reacciona otra vez con un donador de un electrón regresando la enzima a su estado inicial (Reacción V de la Fig. 2). El compuesto II y el compuesto III son inefectivos para la reacción de catalasa. En cambio, el compuesto II es un intermediario catalítico de las peroxidasa (25).

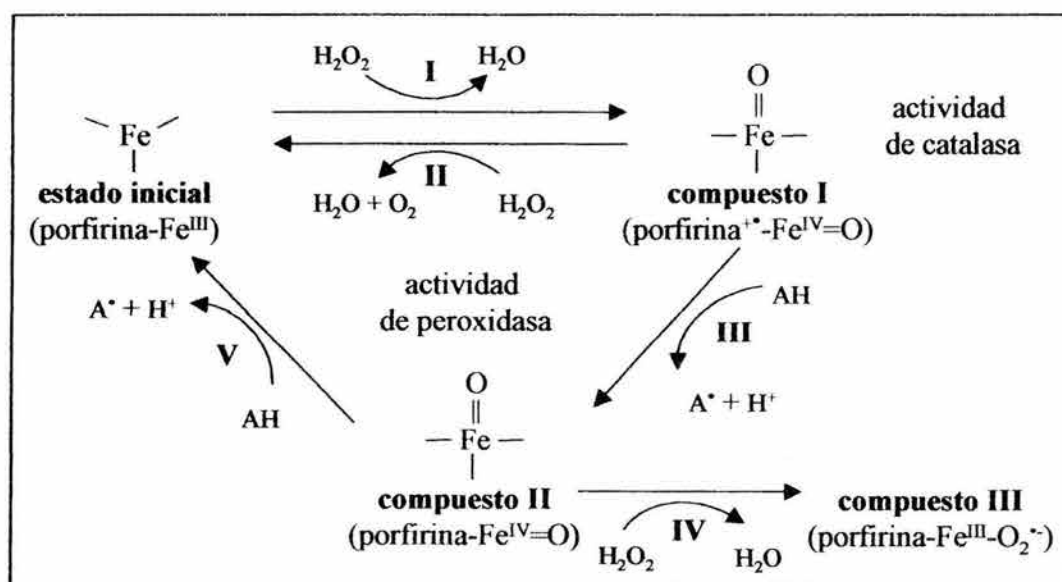


Fig. 2.- Esquema del ciclo catalítico de las catalasas y las peroxidasas. Esquema tomado de la Fig. 1 de la referencia 25.

La catalasa también puede utilizar algunos sustratos pequeños en reacciones de peroxidasa, aunque lo hace con una eficiencia mucho menor (1000 veces menor) que la reacción de catalasa. En la reacción de peroxidasa de la catalasa, el compuesto I oxida sustratos como el metanol, el etanol, el formato o el nitrato (26). En el cerebro, la reacción de la catalasa con el etanol forma acetaldehído, que es tóxico y explica algunos de los efectos neurológicos de la intoxicación alcohólica en humanos (27).

Diferencias entre las catalasas

Las catalasas monofuncionales unen un grupo hemo por subunidad y se caracterizan por presentar actividad en un intervalo amplio de pH (5.0 a 10.5). Son enzimas muy estables, resistentes a múltiples agentes desnaturizantes y disolventes. Se inactivan específicamente con el 3-amino-1,2,4-triazol ($C_8H_{11}N_7O_2$). Como hemoproteínas, las catalasas se inactivan con la azida y la hidroxilamina, y se inhiben con cianuro. La mayoría de las catalasas son homotetrámeros, aunque también se han reportado dímeros e inclusive trímeros (12, 14), aunque es probable que estas estructuras se produzcan como artificios durante la purificación de las enzimas.

Las catalasas monofuncionales son de dos tipos: las catalasas con subunidades pequeñas (masa molecular \approx 60 kDa) (Fig. 3A) y las catalasas con subunidades grandes (masa molecular \approx 80 kDa) (Fig. 3B).

Un análisis filogenético de 256 catalasas monofuncionales sugiere que la enzima ha evolucionado a través de por lo menos dos eventos de duplicación génica produciendo tres clados principales. El clado¹ 1 contiene las catalasas de subunidades pequeñas de las plantas y un subgrupo de las bacterias; el clado 2 contiene las catalasas de subunidades grandes de los hongos y un segundo subgrupo de bacterias; y el clado 3 contiene las catalasas de subunidades pequeñas de bacterias, hongos, protistas, animales y plantas (Fig. 4) (29-30).

¹ **Clado.** - Es un grupo de especies cuyos integrantes descienden de una misma especie troncal. También se le conoce como grupo monofilético.

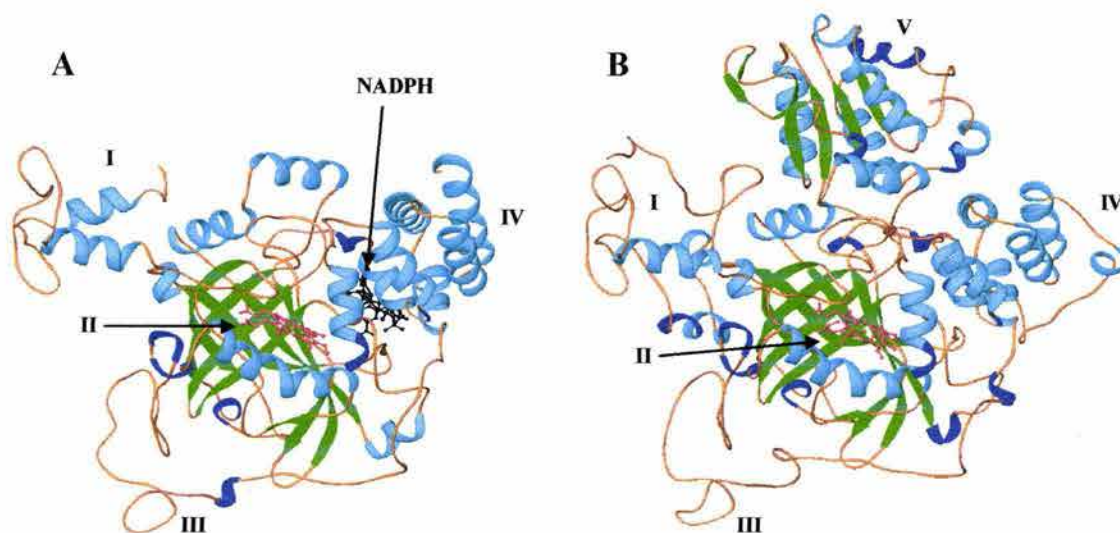


Fig. 3.- La estructura de las catalasas. A. El monómero de la catalasa de eritrocitos humanos (HEC), una catalasa pequeña (clado 3). B. El monómero de la catalasa HPII de *E. coli*, una catalasa grande (clado 2). El dominio I corresponde al extremo N-terminal, II es el barril β , III es el asa envolvente, IV es el dominio de hélices y V es el dominio del extremo C-terminal con topología semejante a la flavodoxina. También se muestra la molécula de NADPH unida a la catalasa pequeña. Las imágenes se generaron con el programa Ribbons (28) con los archivos PDB: 1DGF y 1GGE, respectivamente.

Las catalasas del clado 3 unen NADPH (Fig. 3A), son menos resistentes a la desnaturalización, tienen Fe-protoporfirina IX (hemo *b*) (Fig. 5A) y se inhiben e inactivan con el sustrato (Fig. 6A). La unión del NADPH probablemente evita la formación del compuesto II y III (26-27). Las catalasas del clado 2 no unen NADPH, tienen un dominio en el extremo C-terminal semejante a la flavodoxina (Fig. 3B), son muy resistentes a la desnaturalización, tienen hemo *d* (con un *cis*-hidroxilo y una γ -espirolactona en el anillo pirrólico III) (Fig. 5B) y son resistentes al H_2O_2 (Fig. 6B) (32-33). Los pocos reportes sobre las catalasas del clado 1 indican que éstas no unen NADPH, pues no tienen los aminoácidos requeridos para la unión del dinucleótido. De manera similar a las catalasas del clado 3, las catalasas del clado 1 son menos resistentes a la desnaturalización y también se inhiben e inactivan con el sustrato (14, 34).

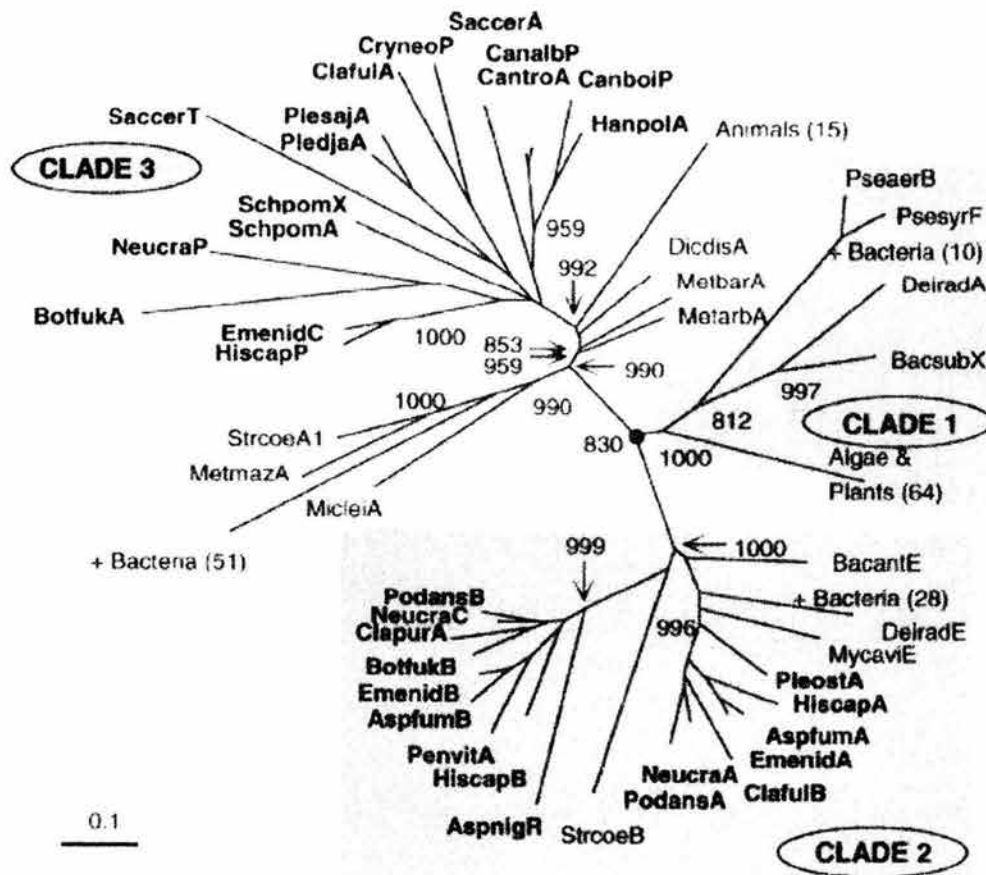


Fig. 4.- Análisis filogenético de las catalasas monofuncionales. El árbol filogenético se obtuvo a partir de un alineamiento múltiple de las secuencias de las catalasas. En la imagen están los tres clados y las catalasas de hongos están marcadas en letras negras para resaltar su ubicación. Imagen tomada de la figura 3 de la referencia 31.

La HP11 es más resistente a altas temperaturas que la catalasa del hígado de bovino (Bovine liver catalase). Así, la BLC se inactiva completamente al incubarla por 30 min a 64°C, mientras que la HP11 lo hace en 20 min a 86°C. La HP11 también es resistente a detergentes (1% SDS) y agentes desnaturizantes como urea (7.0 M) o clorhidrato de guanidina (4.0 M). En cambio, en estas condiciones la BLC se inactiva completamente (35).

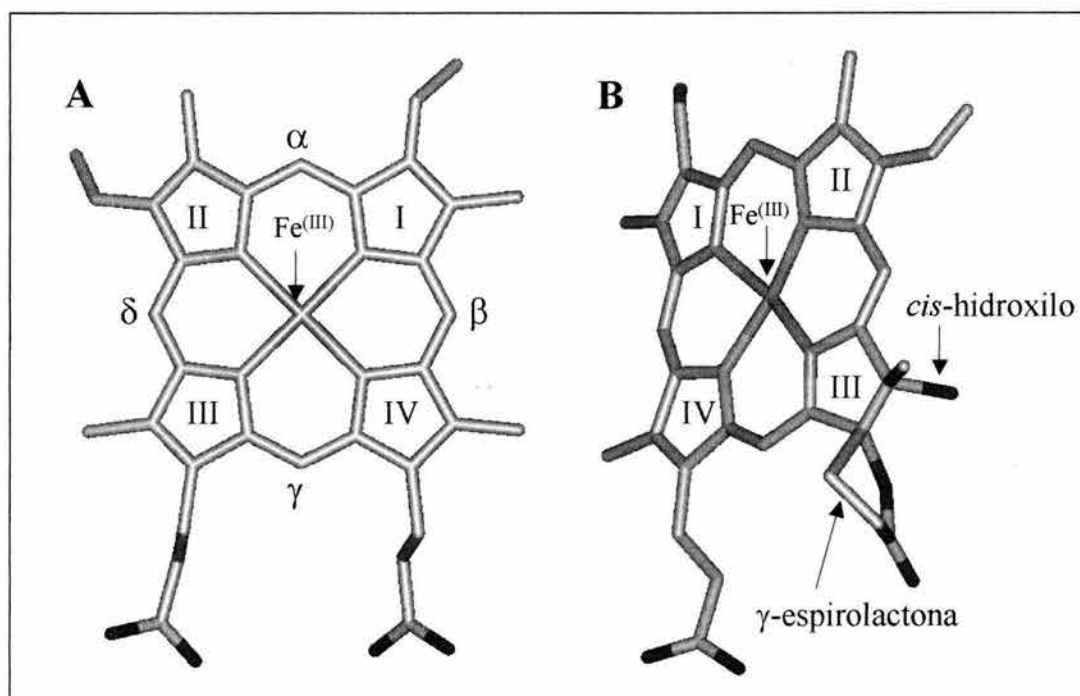


Fig.5.- La estructura del hemo en las catalasas. A. El hemo *b* en la catalasa humana (HEC). B. El hemo *d* de la catalasa HP11. En esta última se muestra el *cis*-hidroxilo y el anillo de la γ -espirolactona en el anillo pirrónico III. El hemo *d* tiene una rotación de 180° respecto al hemo *b* de la HEC. Las imágenes se generaron con los archivos PDB: 1DGF y 1GGE respectivamente.

La cinética de la reacción de catalasa

La catalasa BLC, que es una catalasa pequeña del clado 3, se inactiva con 200 mM de H_2O_2 , mientras que la CatR de *Aspergillus niger*, que es una catalasa grande (clado 2), no muestra inhibición ni inactivación con 5.0 M de sustrato. El compuesto II es responsable de la inhibición reversible de la BLC en altas concentraciones de sustrato (26). Otra catalasa grande que no se inhibe ni se inactiva con altas concentraciones de H_2O_2 (5.0 M) es la HP11 de *E. coli* (Fig. 6B) (14). Además de su resistencia al H_2O_2 , la CatR y la HP11 tienen una cinética compleja que no se ajusta bien al modelo de Michaelis-Menten (Fig. 6B). En cambio, las catalasas pequeñas reportadas en la literatura presentan inhibición en concentraciones altas de sustrato (Fig. 6A) (14).

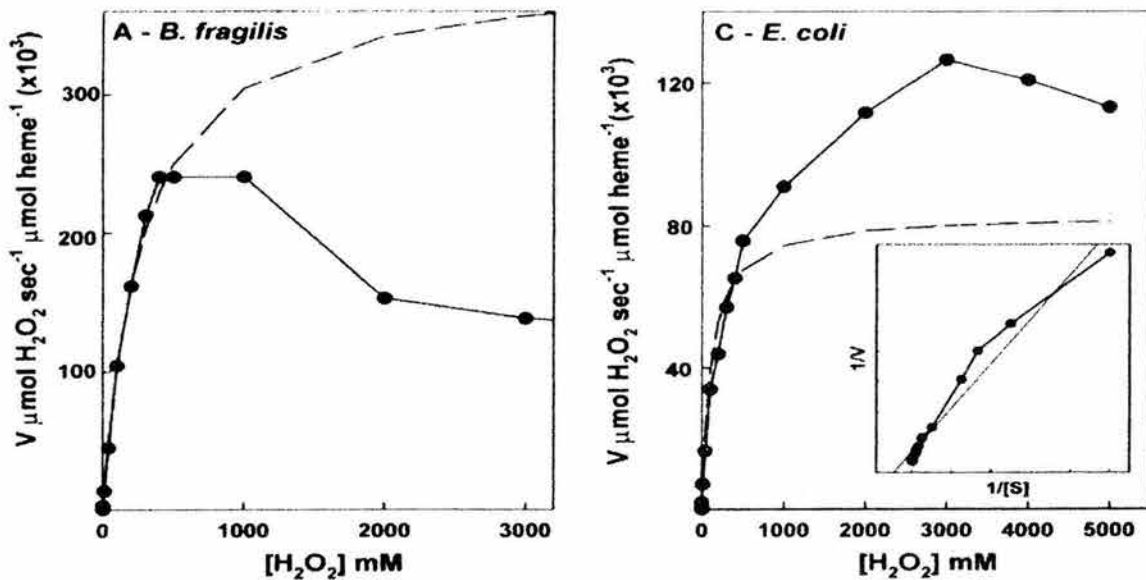


Fig. 6. Cinética de saturación de la catalasa. La línea continua representa los datos observados y la línea cortada representa la curva teórica de Michaelis-Menten. A. La enzima de *Bacillus fragilis*, una catalasa de subunidades pequeñas. B. La HPII, una catalasa de subunidades grandes. En B se incluye la gráfica de dobles recíprocos que ilustra la divergencia de los datos observados respecto a la cinética de Michaelis-Menten. La imagen se tomó de la Fig. 2 de la referencia 14.

Estructura tridimensional de las catalasas

Para poder entender estas diferencias funcionales es importante conocer la estructura tridimensional de las distintas catalasas y establecer correlaciones estructura-función.

Se ha determinado la estructura tridimensional de ocho catalasas. Cuatro de éstas son de los procariontes: *Micrococcus lysodeikticus* (MLC) (15, 36), *Proteus mirabilis* (PMC) (37), *E. coli* (HPII) (38-39) y *Pseudomonas syringae* (CatF) (30), y cinco catalasas son de los eucariontes: bovino (BLC) (40-41), *Penicillium vitale* (PVC) (42), *S. cerevisiae* (SCCA) (10) y eritrocitos humanos (HEC) (27) (Tabla I). Las catalasas anteriores son pequeñas, excepto la HPII y la PVC. La mayoría de las estructuras de catalasas determinadas son del clado 3. La PVC y HPII pertenecen al clado 2 y únicamente la CatF pertenece al clado 1 (29-30). Estas catalasas son homotetrámeros, tienen un grupo hemo por subunidad y una simetría molecular 222. La simetría molecular 222 se caracteriza por tener tres ejes de rotación de orden dos (180°), que son perpendiculares entre sí. Esta

simetría describe un tetrámero de subunidades idénticas. Cuando a una subunidad se le aplica una rotación de 180° en el eje X, otra de 180° en el Y y otra de 180° en el Z se genera el tetrámero. Lo anterior indica que las catalasas son tetrámeros con subunidades idénticas (42). En la literatura sobre catalasas, los ejes X, Y, y Z corresponden a los ejes P, R y Q según se describieron en la BLC (40).

Las catalasas monofuncionales están formadas por los siguientes dominios: 1) el extremo amino terminal, 2) un barril β , 3) el asa envolvente, 4) un dominio de hélices (Fig. 3A) y, en el caso de las catalasas grandes, el dominio tipo flavodoxina del extremo carboxilo terminal (Fig. 3B) (40, 42-43).

La principal diferencia estructural entre las catalasas pequeñas y las grandes es la presencia en estas últimas de un dominio extra de aproximadamente 150 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal. Éste es un dominio del tipo α/β formado por cuatro hélices alfa y ocho hebras β , cuya topología es semejante a la flavodoxina (Fig. 3B) (43). Se desconoce la función de este dominio y no hay evidencia experimental de que pueda unir un nucleótido.

Tabla I.- Las catalasas monofuncionales cuya estructura cristalográfica ha sido determinada.

| Especie | Nombre | Código PDB | Grupo espacial | Resolución (Å) | Clado |
|----------------------------------|--------|------------|---|----------------|-------|
| <i>Penicillium vitale</i> | PVC | 4CAT | P ₃ ,2 ₁ | 3.00 | 2 |
| <i>Bos taurus</i> | BLC | 8CAT | P ₃ ,2 ₁ | 2.5 | 3 |
| <i>Micrococcus lysodeikticus</i> | MLC | 1GWE | P ₄ ,2 ₁ ,2 | 0.88 | 3 |
| <i>Escherichia coli</i> | HP11 | 1GGE | P ₂ , ₁ | 1.89 | 2 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | PMC | 1M85 | P ₆ ,2 ₂ | 2.00 | 3 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | SCCA | 1A4E | P ₆ ,2 ₂ | 2.40 | 3 |
| <i>Homo sapiens</i> | HEC | 1DGF | P ₂ , ₁ ,2 ₁ ,2 ₁ | 1.50 | 3 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> | CatF | 1M7S | P ₂ , ₁ | 1.80 | 1 |

Las catalasas pequeñas que pertenecen al clado 3 (SCCA, BLC, MLC, PMC y HEC) unen una molécula de NADPH. En las catalasas grandes (PVC y HP11), los aminoácidos entre el dominio de las hélices y el extremo C-terminal impiden la unión del NADPH. El sitio de unión para el NADPH está localizado a 19 Å del Fe del hemo. El NADPH se une a las catalasas con un plegamiento único entre las oxidorreductasas. Los aminoácidos de la cavidad que une el NADPH están muy conservados en las catalasas del clado 3 (27, 37).

Los resultados bioquímicos muestran que el NADPH está implicado en una reacción redox con el hemo. Las catalasas podrían utilizar el NADPH como una molécula donadora de electrones para evitar la formación de los compuestos II y III que son inactivos. Se han propuesto rutas probables para los electrones que van del NADPH al sitio activo de la enzima. Las catalasas grandes no unen al NADPH pero tampoco tienden a formar los compuestos II y III. No se conoce la razón por la cual las catalasas grandes no se inactivan con el sustrato.

En las catalasas de los tres clados los dímeros se forman por el enganche mutuo de dos monómeros. El extremo amino terminal de un monómero se entrelaza como un gancho con el asa envolvente del monómero relacionado en el eje Q (Fig. 7A). El tetrámero es un dímero de dímeros, que tiene una estructura compacta con dimensiones de 150 x 100 x 80 Å en las catalasas grandes (Fig 7B) (43).

La alta resistencia de las catalasas al calor y los desnaturalizantes se debe en parte al entrelazamiento de los monómeros para formar los dímeros activos. Los monómeros de las catalasas no son activos. El dominio del extremo C-terminal en las catalasas grandes y la glicosilación reportada para algunas catalasas de hongos podrían contribuir también a su estabilidad (39).

En la estructura cristalográfica de la catalasa HP11 se encontró un enlace covalente inusual entre la His392 y la Tyr415 que se coordina con el Fe del hemo (39). El enlace es entre el N δ del imidazol de la His y el C β de la Tyr. La distancia de este enlace es de 1.6 Å y está conservado en las cuatro subunidades de la HP11. Los mapas de densidad electrónica y un análisis de espectrometría de masas de los péptidos obtenidos de una digestión con tripsina confirman la existencia del enlace covalente (44). Se ha propuesto que tanto la modificación del hemo *b* como la formación del enlace covalente His-Tyr en la HP11

necesitan de la actividad catalítica. Asimismo, se propone que el compuesto I actúa como iniciador de estas reacciones (33). No se conoce la función del enlace covalente en la HP11 y no hay reportes de enlaces covalentes inusuales en las catalasas pequeñas.

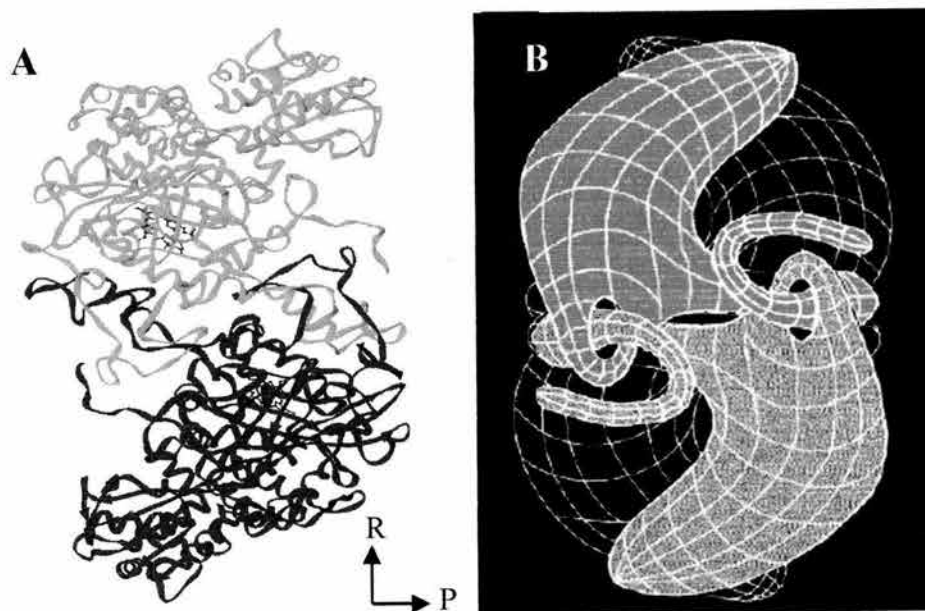


Fig. 7.- La dimerización en las catalasas. A. El dímero de una catalasa grande (HP11). Se muestra como están entrelazados los monómeros en el dímero. B. Una representación esquemática del tetrámero de la

HP11, donde se resalta la dimerización de los monómeros entrelazados. La figura A se generó con el programa Ribbons (28) con el archivo PDB 1GGE de la HP11 y el esquema B se tomó de la referencia 39.

El grupo hemo y su función

La localización del hemo y su ambiente están muy conservados en las catalasas. El hemo no está unido covalentemente y se encuentra enterrado entre el barril β y dos hélices ($\alpha 4$ y $\alpha 12$). La distancia del hemo a la superficie del tetrámero es de aproximadamente 20 Å. Los grupos propionato del hemo están enterrados y estabilizados por puentes salinos con tres argininas conservadas (42-43, 45).

En la PVC, la HP11 y la CatF el hemo tiene una orientación diferente al hemo de las catalasas del clado 3 (BLC, PMC, MLC, SCCA y HEC) (Fig. 5A). Entre estos dos grupos de catalasas, el hemo está girado 180° en el eje α - γ -meso-carbono de tal manera que los grupos metilo y vinilo de los anillos I y II cambian sus posiciones (Fig. 5B) (30, 38-39, 42).

La CatF de *P. syringae* es hasta ahora la única catalasa pequeña en donde el hemo está invertido con respecto a las demás catalasas pequeñas. Otra manera de describir la orientación del hemo en las catalasas considera la histidina esencial del sitio activo. La orientación del hemo de las catalasas pequeñas del clado 3 se denomina His-III, ya que el anillo III del hemo está cercano a la histidina esencial y, en las catalasas del clado 1 y 2 se denomina His-IV, ya que en este caso es el anillo IV del hemo el que está cercano a la histidina esencial (30). La inversión del hemo se ha descrito en otras hemoproteínas como la mioglobina y el citocromo *b5*, generalmente como un equilibrio dinámico entre las dos orientaciones del hemo (45). Se desconoce si la orientación del hemo en las catalasas tiene un efecto funcional.

El hemo divide en dos la cavidad donde se encuentra: la parte proximal está más cerca de los ejes de simetría de la molécula y la distal más alejada del centro y más próxima a la superficie. Hay tres aminoácidos esenciales involucrados en la catálisis: una histidina y una asparagina en el lado distal y una tirosina en el lado proximal del hemo. El oxígeno de la tirosina esencial se coordina con el FeIII del hemo. El lado distal de la cavidad del hemo es muy hidrofóbico y tiene varias fenilalaninas conservadas (42-43). En la cavidad distal del hemo de todas las estructuras de catalasas hay moléculas de agua que están relativamente fijas (15, 30). El sustrato llega al sitio activo a través de un canal hidrofóbico de aproximadamente 25 Å de largo que está lleno de moléculas de agua.

Las catalasas BLC, PMC, MLC, SCCA, HEC y CatF tienen como grupo prostético un hemo *b* (Fig. 5A). En cambio las catalasas PVC y HP11 tienen la configuración de un hemo modificado, llamado hemo *d*, con un *cis*-hidroxilo y una γ -espirolactona en el anillo pirrólico III (Fig. 5B). Se propone que el hemo *d* es el resultado de una dihidroxilación en el anillo III del hemo *b*, donde uno de los hidroxilos forma el ciclo de la lactona con uno de los propionatos. No hay cambios importantes en el volumen entre las estructuras del hemo *b* y *d* (43, 45). La PVC y la HP11 tienen casi exclusivamente hemo *d* y en ciertos casos una pequeña fracción de hemo *b*. La BLC nativa aislada tiene 50% de su hemo como biliverdina y bilirrubina, que son productos de la degradación oxidativa del hemo (45).

La tensión oxidativa y su relación con la diferenciación celular en *N. crassa*

En *N. crassa* la formación de esporas asexuales o conidios se inicia de manera sincronizada cuando un cultivo líquido se filtra y la masa micelial se expone al aire (46-47). Los filamentos (hifas) en contacto directo con el aire se adhieren durante los primeros 40 min, el micelio adherido inicia el crecimiento de hifas aéreas después de 2 h y, finalmente, se forman los conidios en las puntas de las hifas aéreas ramificadas 9 h después de la exposición al aire. La formación de los conidios a partir de hifas en crecimiento involucra tres transiciones morfogénicas: i) de las hifas en crecimiento al micelio adherido, ii) del micelio adherido a las hifas aéreas y iii) de las hifas aéreas a los conidios. Al inicio de cada transición morfogénica se desarrolla un estado hiperoxidante (48-52). El estado hiperoxidante se define como un estado inestable, en el cual las especies de oxígeno reactivas sobrepasan la capacidad antioxidante de la célula. El estrés oxidativo también se desarrolla al inicio de la germinación de los conidios (53). Con base en estos resultados, se ha propuesto que la diferenciación celular se da como una respuesta a un estado hiperoxidante (6, 11).

Las catalasas de *N. crassa*

N. crassa tiene cuatro catalasas, la catalasa-1 (CAT-1), la catalasa-2 (CAT-2), la catalasa-3 (CAT-3) y la catalasa-4 (CAT-4). Dos catalasas monofuncionales grandes: la CAT-1, presente en células que no crecen, como los conidios, y la CAT-3, una catalasa inducible presente en células en crecimiento, como el micelio (54). La CAT-2 es una catalasa-peroxidasa presente en las células que se lisan (55). La CAT-4 probablemente sea una catalasa peroxisomal que pertenece al clado 3 (29).

Los genes de la CAT-1 y la CAT-3 se han clonado, secuenciado y caracterizado (54). La mutante sin *cat-3* presenta un incremento en el desarrollo asexual, comparada con la cepa silvestre, debido a una tensión oxidativa (56). La secuencia del extremo N-terminal de la CAT-3 indica que la enzima se procesa y secreta (54). Las actividades de la CAT-1 y CAT-3 están presentes durante el ciclo asexual de *N. crassa* y se expresan de manera diferente (54). Se ha observado una inducción escalonada de la actividad específica de catalasa durante la formación de los conidios. Los conidios tienen 60 veces más actividad que las hifas creciendo en medio líquido (6-7, 54). Este aumento en la actividad de la

catalasa se debe a la síntesis de la CAT-1 durante la formación y la maduración de los conidios (54).

La CAT-1 se modifica en el hemo por el oxígeno singulete (8). La oxidación también ocurre durante la diferenciación del hongo y en condiciones de tensión metabólica, condiciones en las que se genera oxígeno en singulete (8). El hemo de la CAT-1 totalmente modificada (CAT-1e), analizado en una cromatografía en fase reversa con una columna hidrofóbica, da un pico ligeramente más hidrofóbico que el de la CAT-1 no modificada (CAT-1a) (8). El espectro de absorción del hemo de la CAT-1e es más asimétrico que el de la CAT-1a. La modificación hace que el pI de la CAT-1 cambie. La CAT-1a tiene un pI de 5.45 y la CAT-1e tiene un pI de 5.25. La CAT-1 en presencia de una atmósfera de argón analizada en geles de actividad disminuye su modificación. Los desactivadores del oxígeno en singulete como la histidina, el triptófano, la tirosina y el ácido 5-amino-salicílico evitan que ocurra la modificación de la CAT-1a. No se sabe exactamente en qué consiste la modificación de la CAT-1 por el oxígeno.

Además de la CAT-1, la CAT-2 y la CAT-3 se modifican por el oxígeno singulete (8). Finalmente, otras catalasas también se modifican (8).

Considerando la información anterior nos preguntamos: 1) si existen diferencias estructurales y funcionales entre la CAT-1 no modificada y la totalmente modificada por el oxígeno y 2) en qué consiste la modificación del hemo por el oxígeno en la CAT-1. Para contestar estas preguntas se plantearon los siguientes objetivos.

OBJETIVOS

Objetivos generales

El presente trabajo tiene tres objetivos principales. El primero es caracterizar la CAT-1 desde el punto de vista molecular y cinético. El segundo es explorar si existen diferencias estructurales y funcionales entre la CAT-1a y la CAT-1e. El tercero es determinar la estructura cristalográfica de la CAT-1 y relacionar la estructura con la función. Estos objetivos se cumplieron de acuerdo a los siguientes objetivos particulares.

Objetivos particulares

1. Características moleculares de la CAT-1

- a) Determinar la estructura oligomérica de la CAT-1, su estado de glicosilación y su estabilidad en diferentes temperaturas y agentes desnaturalizantes.
- b) Determinar la estabilidad de la CAT-1a y la CAT-1e al calor, el clorhidrato de guanidina y la proteólisis con subtilisina.
- c) Evaluar la estructura secundaria de la CAT-1a y la CAT-1e con espectros de dicroísmo circular.
- d) Conocer la emisión de la fluorescencia de la CAT-1a y la CAT-1e, tanto de la proteína como de los grupos hemo.

2. Características cinéticas de la CAT-1

- a) Determinar la cinética de la CAT-1a y la CAT-1e tanto en bajas como en altas concentraciones de sustrato.
- b) Comparar la actividad de la CAT-1a y la CAT-1e en diferente pH, así como su estabilidad en pH ácido.
- c) Determinar la inhibición con cianuro de la CAT-1a y la CAT-1e, así como su inactivación con el 3-amino-1,2,4-triazol, la azida y la hidroxilamina.
- d) Estimar la energía de activación para la catálisis de la CAT-1a y la CAT-1e.

3. Características estructurales de la CAT-1

- a) Cristalizar la CAT-1 y con los cristales coleccionar datos de difracción de rayos X para determinar la estructura cristalográfica de la enzima.
- b) Determinar si el hemo presenta alguna oxidación.
- c) Comparar la estructura de la CAT-1 con las otras estructuras de catalasas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Los reactivos utilizados en esta tesis se obtuvieron de Sigma y los que son distintos se indican en el texto.

MÉTODOS

Cepas y condiciones de cultivo

La cepa silvestre de *N. crassa*, 74-OR23-1A del Fungal Genetic Stock Center, se cultivó en medio sólido Vogel con sacarosa 1.5% en matraces de 500 ml. Se inocularon 1×10^6 conidios por matraz. Los cultivos se crecieron tres días en oscuridad a 30°C y dos días en luz a 25°C.

Purificación de la CAT-1

La CAT-1 se purificó de acuerdo al método descrito en el primer trabajo (Apéndice A, página 1324). En pocas palabras, el micelio aéreo conidiado se cosechó directamente en acetona. Los polvos de acetona se homogeneizaron en un amortiguador que contenía inhibidores de proteasas y antioxidantes. El extracto se sometió a dos ciclos de congelación/descongelación y después a una centrifugación. El sobrenadante se precipitó con acetona. La muestra se centrifugó y las pastillas se resuspendieron y centrifugaron. El sobrenadante resultante se precipitó con sulfato de amonio 35% y después se centrifugó. La pastilla disuelta se pasó por una columna de fenil-sefariosa (Phenyl-Sepharose CL-4B de Pharmacia) y se eluyó con amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.8. Las fracciones con mayor actividad se mezclaron y se concentraron por centrifugación con las unidades Ultrafree-CL cellulose (5 000 NMWL) de Millipore.

Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína de las fracciones se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad). La concentración de la CAT-1 pura se determinó midiendo la absorbencia a 280 nm y utilizando un coeficiente de extinción de $88\ 810\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ estimado a partir de su secuencia de aminoácidos (57).

Entrecruzamiento con glutaraldehído y la determinación de la glicosilación de la proteína

El entrecruzamiento con glutaraldehído y la determinación de la glicosilación de la CAT-1 se describen en el primer trabajo (Apéndice A, página 1324).

Modificación de la CAT-1a en CAT-1e

La modificación de la catalasa se promovió por almacenamiento en congelación (-20°C) durante ocho semanas en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.8.

Ensayos enzimáticos

La actividad de la catalasa se determinó por oximetría (58). La reacción se inició inyectando la catalasa (generalmente 0.2 µg en 5 µl o 0.04 µg en 1 µl) en una cámara sellada que contenía 2 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.8 y una concentración conocida de H₂O₂. La concentración de H₂O₂ se determinó midiendo su absorbencia a 240 nm, considerando un coeficiente de extinción de 35.76 M⁻¹ cm⁻¹. Una unidad se definió como las µmol de H₂O₂ consumidas por minuto a 22°C. Los datos de las reacciones enzimáticas se analizaron con el programa Microcal Origin 6.0 (Microcal Software, Inc. Northampton, MA, USA).

En el ensayo de actividad en diferentes valores de pH se elaboró una mezcla de los amortiguadores MES, HEPES, CHES y CAPS 50 mM ajustando el pH deseado con 0.5 M de HCl o NaOH. La actividad de la catalasa se midió con 10 mM de H₂O₂.

La estabilidad en pH ácido se determinó incubando la CAT-1 durante 5 min a temperatura ambiente en amortiguador de acetatos 50 mM a un determinado pH (3.0 a 6.0). Como control se usó amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.8. La actividad residual se midió por oximetría en H₂O₂ 10 mM.

La inactivación de la CAT-1 con 3-amino-1,2,4-triazol se determinó incubando 20 µg de la enzima a 37°C en 1 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.8, conteniendo 3-amino-1,2,4-triazol 20 mM, ascorbato 4 mM y H₂O₂ 4 mM. Cada 5 min se tomaron muestras (50 µl) de la mezcla y se midió la actividad residual. La inactivación con azida e hidroxilamina se realizó incubando la enzima (1 µg en 2 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.8) a 37°C durante un min en una concentración diferente del inactivador y la

actividad residual se midió adicionando 10 mM de H₂O₂ a la mezcla. La inhibición de la CAT-1 (0.2 µg en 5 µl) con cianuro (Merck, México) se midió a diferentes concentraciones del inhibidor (0.4 a 1.0 µM) y diferentes concentraciones de H₂O₂ (8 a 60 mM).

La energía de activación para la catálisis de la CAT-1 se determinó a partir de las gráficas de Arrhenius (ln k_{cat} vs. 1/K) obtenidas midiendo la actividad de la catalasa (0.04 µg en 1 µl) entre 20 y 700 mM de H₂O₂ en las temperaturas de 15, 20, 25 30 y 35°C.

Ensayos de estabilidad

Los ensayos de estabilidad de la catalasa al calor, KCl, SDS (Bio-Rad) y clorhidrato de guanidina (Boehringer Mannheim) se describen en el primer trabajo (Apéndice A, página 1325).

La estabilidad de la CAT-1a y la CAT-1e en condiciones de diferente temperatura y diferentes concentraciones de clorhidrato de guanidina se describen en el segundo trabajo (Apéndice B, página 8).

Electroforesis en geles de poliacrilamida

La catalasa se separó por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) al 10% en condiciones desnaturizantes. La actividad y la proteína de la catalasa también se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% en condiciones no desnaturizantes.

Tratamiento con subtilisina

La concentración de subtilisina se determinó por su absorbencia a 280 nm con un coeficiente de extinción de 24 870 M⁻¹ cm⁻¹ (Horacio Reyes Vivas comunicación personal). La CAT-1 se incubó con subtilisina en una relación de 7:1 a 30°C durante 28 h en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.8. En los diferentes tiempos la reacción se detuvo adicionando 1.5 µl de PMSF 1 M en DMSO y la actividad se midió por oximetría y la proteína se analizó por SDS-PAGE y PAGE en condiciones no desnaturizantes (59).

Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular se realizaron con 200 $\mu\text{g/ml}$ de CAT-1 en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.8, de 185 a 250 nm y se expresaron en elipticidad molar (Θ) ($\text{grados cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$). La cantidad de estructura secundaria se determinó con el programa Prosec (AVIV Instruments).

Fluorescencia de la proteína y del hemo

Los espectros de la emisión de fluorescencia de la proteína se registraron con 150 $\mu\text{g/ml}$ de CAT-1 en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.8, excitando a 280 nm. La emisión de la fluorescencia se registró de 300 a 400 nm a 25°C.

Los espectros de la emisión de fluorescencia del hemo se registraron con 5 mg/ml de CAT-1 en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.8, excitando a 400 nm. La emisión de la fluorescencia se registró en el intervalo de 420 a 700 nm a 25°C.

Cristalización y colecta de datos

La CAT-1 (9 mg/ml) en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.8, se cristalizó por el método de la gota colgante, en sulfato de amonio 2.0 M (condición # 32 del Kit I de Hampton Research), a 18°C. Se formaron gotas con 5 μl de proteína más 5 μl de agente precipitante y en el pozo se pusieron 750 μl de agente precipitante.

Los cristales de la CAT-1 aparecieron a los cuatro días formando hexágonos irregulares de color verde, que alcanzan su tamaño máximo en aproximadamente un mes.

Un cristal con dimensiones 0.36 x 0.20 x 0.02 mm se difractó en la línea 9-1 del sincrotrón de Stanford (Stanford Synchrotron Radiation Laboratory SSRL), enfriándolo con nitrógeno líquido. La solución de crioprotección fue glicerol 31% con sulfato de amonio 2.0 M. Las reflexiones de 119 imágenes se integraron con el programa DENZO (60) y se escalaron con programas de CCP4 (Collaborative Computational Project, No. 4) (61).

Determinación de la estructura y afinamiento

La estructura de la CAT-1 se determinó a 1.75 Å por el método del reemplazo molecular, usando las coordenadas de la catalasa HP11 de *E. coli* (39) (con 45% de identidad en secuencia con la CAT-1) como modelo inicial. La rotación y la translación se realizaron con el programa CNS (Crystallography and NMR system) (62).

El afinamiento se llevó a cabo usando los protocolos estándar de CNS (62). Los mapas de densidad electrónica 2fo-fc y fo-fc se revisaron con el programa O (63) para hacer el afinamiento manual y la construcción de algunas partes del modelo. Se reservó el 10% de los datos, escogidos de manera aleatoria, para calcular el R_{free} . El afinamiento consistió en alternar ciclos de afinamiento manual y automático. Se empleó la simetría no cristalográfica estricta, pero, al final se generó el dímero que es la unidad asimétrica. Los últimos mapas de densidad electrónica se revisaron con una lista de picos elaborada con el programa DDQ (Difference density quality) (64) para corregir la posición de algunos átomos en el modelo. Para el afinamiento del grupo hemo, se hicieron algunos modelos de hemo con el programa O (63), cuyos archivos de topología y parámetros se crearon con HIC-Up (Hetero-compound Information Centre-Uppsala). La adición de las moléculas de agua en el modelo se generó automáticamente con CNS (62).

Secuenciación del extremo N-terminal

Se cargaron 15 μg de CAT-1 en tres carriles (5 μg por carril) de un SDS-PAGE al 10% y se transfirieron por 2.5 h a una membrana de PVDF (polivinildifluorobenceno) usando como amortiguador de transferencia CAPS 10 mM y metanol al 10%, pH 8.0 a 4°C. La membrana de PVDF se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 0.1% en metanol 50% y se destiñó con metanol al 50% y ácido acético al 10%. La membrana seca se envió al Instituto Pasteur (Département des Biotechnologies) para la determinación de la secuencia del extremo amino terminal.

Espectrometría de masas

La muestra de la CAT-1 para la espectrometría de masas se preparó de acuerdo con los protocolos de W. M. Keck Facility de la Universidad de Yale. 2 μg de CAT-1 se cargaron en un SDS-PAGE al 10%. El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R250 0.1% en ácido acético 10% y metanol al 50%, y se destiñó por 3 h en ácido acético 10% y metanol 50% con agitación.

La banda de la proteína se cortó y se envió a W. M. Keck Facility de la Universidad de Yale para hacer una digestión con tripsina en el gel y la espectrometría de masas de los péptidos resultantes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis están descritos en tres trabajos. El primer trabajo describe la caracterización molecular y cinética de la CAT-1 y fue publicado en la revista *Free Radical Biology and Medicine* (Anexo A). El segundo trabajo versa sobre las diferencias en la estructura y en la función entre la CAT-1a y la CAT-1e. Estos datos se encuentran en el manuscrito del anexo B que se sometió para su publicación a la revista *Free Radical Biology and Medicine*. El tercer trabajo consistió en determinar la estructura cristalográfica de la CAT-1. El manuscrito se encuentra en el anexo C y está aceptado para su publicación en la revista *Journal of Molecular Biology*.

A continuación se resumen los resultados y la discusión de los primeros dos trabajos.

I. Caracterización molecular y cinética de la CAT-1

a) Caracterización molecular

La CAT-1 se acumula particularmente en los conidios, constituyendo el 0.6% de la proteína total, indicando su función en la germinación. El método de purificación aumentó 170 veces la actividad específica y tuvo un rendimiento del 48%. A partir de 2 g de polvos de acetona de micelio aéreo y conidios se obtuvieron 1.5 mg de enzima pura. La CAT-1 purificada, separada por electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, muestra una banda mayoritaria de aproximadamente 88 kDa y algunas bandas contaminantes en muy baja concentración (Fig. 8). La pureza de la CAT-1 fue mayor al 95%. Tanto la pureza como la cantidad de la CAT-1 permitieron hacer la caracterización molecular y cinética, así como obtener cristales para determinar la estructura cristalográfica de esta enzima.

Los resultados del entrecruzamiento de la CAT-1 con glutaraldehído apoyan que esta enzima es un homotetrámero, como la mayor parte de las catalasas monofuncionales descritas.

La CAT-1 se tiñó con el reactivo de Schiff's, mostrando que la enzima está glicosilada. Además, la CAT-1 se unió a la lectina Concanavalina A, indicando que las hexosas son probablemente α -glucosa y/o α -manosa (Fig. 9). La glicosilación también se ha reportado en otras catalasas de hongos como la CatR de *A. Níger*, que tiene

principalmente manosas (65). La CatB de *Aspergillus nidulans* tiene cuatro sitios diferentes de N-glicosilación (Asn-118, 446, 549 y 610) (66), tres de los cuales están conservados en las secuencias de la Cat1 de *Aspergillus fumigatus* (67), la catalasa de *Histoplasma capsulatum* (68) y la CAT-3 de *N. crassa*, que son enzimas homólogas. En la CAT-1 sólo se conserva el último sitio de N-glicosilación, aunque existen otros tres sitios probables. La enzima homóloga a la CAT-1 es la CatA de *A. nidulans* (1).

Fig. 8.- Purificación de la CAT-1. SDS-PAGE al 10% teñido con azul brillante de Coomassie con las fracciones principales (10 µg) de la purificación. Los carriles son, respectivamente, extracto total (ET), fracción soluble (FS), extracto después de dos ciclos de congelación y descongelación (CD), precipitación con acetona (A), precipitación con sulfato de amonio (SA), y la elución de una columna de fenil-sefarosa CL-4C (F). El último carril corresponde a los estándares de masa molecular (PM).

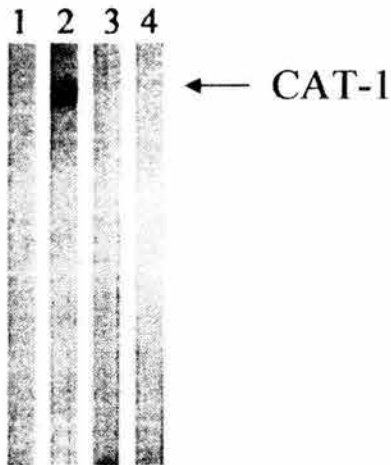
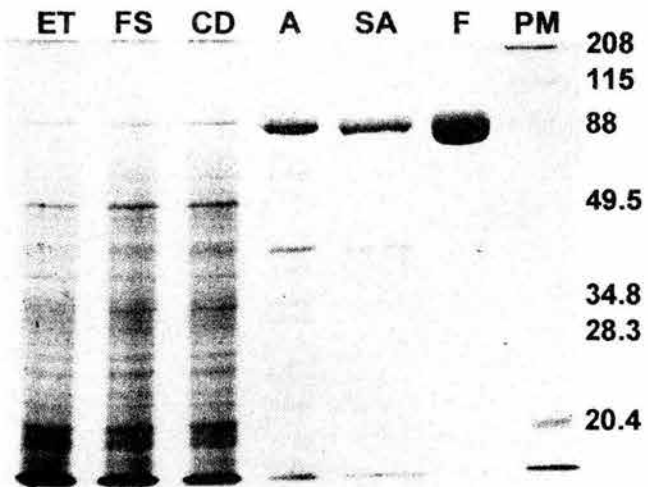


Fig. 9.- Unión de la CAT-1 a la Concanavalina-A. La CAT-1 purificada separada por PAGE se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Las tiras de nitrocelulosa después de la incubación con α -IgG de conejo unido a peroxidasa se tiñeron por peroxidasa. Línea 1, amortiguador salino de fosfatos; línea 2, incubada con Concanavalina-A (100 µg/ml) y α -IgG de conejo-peroxidasa; línea 3, Concanavalina-A; línea 4, α -IgG de conejo-peroxidasa.

b) Caracterización cinética

La CAT-1 perdió el 50% de su actividad al incubarla por 70 min a 93°C. La enzima no se inactivó en presencia de SDS 0.4 M (incubada 30 min a temperatura ambiente) y concentraciones molares de KCl (4.0 M) (incubada 24 h a temperatura ambiente). Con urea 9.0 M perdió sólo el 27% de su actividad pero la recuperó cuando se dializó la enzima y se inactivó con clorhidrato de guanidina sólo en concentraciones mayores a 4.5 M (incubada 48 h a temperatura ambiente). Estos datos documentan la gran resistencia de la CAT-1 a la desnaturalización. La CAT-1 es más resistente a la desnaturalización que la mayoría de las enzimas y que otras catalasas. La CAT-1, la CatB de *A. nidulans* y la HP11 también son resistentes a la desnaturalización con detergentes (1% SDS) y con agentes desnaturalizantes como la urea (9.0 M) o el clorhidrato de guanidina (4.0 M). En cambio, en estas condiciones la BLC se inactiva completamente (35, 66).

La CAT-1 presentó una meseta de actividad en un intervalo de pH de 4.0 a 12.0. La enzima se inactivó con 20 mM de 3-amino-1,2,4-triazol (constante de inactivación de pseudo-primer orden k de $0.054 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$) (Fig. 10A) y fue resistente a los disolventes orgánicos acetona, hexano, cloroformo y etanol. Los resultados anteriores apoyan que la CAT-1 es una catalasa monofuncional. Asimismo, la CAT-1 se inactivó con la azida (constante de inactivación de segundo orden k de $2.11 \pm 0.03 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$) (Fig. 10B) y la hidroxilamina (constante de inactivación de segundo orden k de $3.54 \pm 0.07 \text{ }\mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) (Fig. 10C), y se inhibió competitivamente con cianuro (constante de inhibición K_i de $0.76 \pm 0.05 \text{ }\mu\text{M}$). Comparada con las catalasas grandes, CatR y HP11, la CAT-1 resultó ser más sensible al cianuro que la CatR y menos sensible que la HP11 y también menos sensible a la azida. En cambio, la CAT-1 se inactivó con la hidroxilamina de manera similar a otras catalasas (14). La estructura cristalográfica de varios complejos de catalasas con inactivadores e inhibidores muestra claramente como interactúan éstos con el sitio activo. La estructura de la catalasa humana determinada con 3-amino-1,2,4-triazol muestra que este inactivador está unido covalentemente a la His75 esencial, impidiendo que se lleve a cabo la catálisis. Se sabe que la reacción de inactivación de la catalasa con el 3-amino-1,2,4-triazol es con el compuesto I (27). La estructura de la SCCA determinada con azida unida y de la HEC con cianuro unido indican que estos inactivadores están coordinados con el Fe del hemo, bloqueando de esta manera el acceso al sitio activo (10, 27).

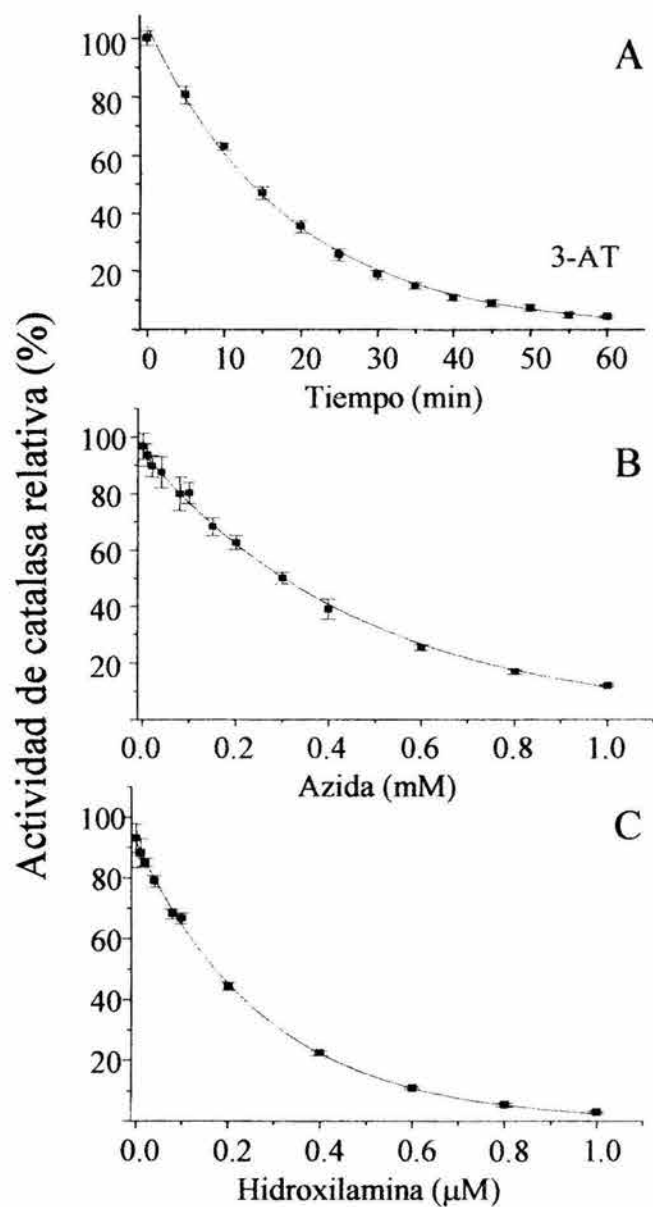


Fig. 10.- Inactivación de la CAT-1. A. Curso temporal de inactivación de la CAT-1 después de la incubación con 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) 20 mM. B. Inactivación de la CAT-1 con diferentes concentraciones de azida. C. Inactivación de la CAT-1 con diferentes concentraciones de hidroxilamina.

La CAT-1 no se inhibió en concentraciones molares de H_2O_2 . Los datos, tanto en bajas como en altas concentraciones de sustrato, con el modelo de Michaelis-Menten, dieron las siguientes constantes. En concentraciones milimolares de sustrato la CAT-1 tuvo una K_m aparente de 21.7 ± 0.5 mM, una V_{max} aparente de $1.67 \pm 0.16 \times 10^6$ U/mg, una k_{cat}

de $8.9 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ y una eficiencia catalítica k_{cat}/K_m de $4.11 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En concentraciones molares de sustrato tuvo una K_m de $232.6 \pm 12.7 \text{ mM}$, una V_{max} de $9.49 \pm 0.13 \times 10^6 \text{ U/mg}$, una k_{cat} de $5.06 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ y una eficiencia catalítica k_{cat}/K_m de $2.17 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Los valores de las constantes cinéticas son similares a los reportados para otras catalasas (14). La eficiencia catalítica de esta enzima es enorme, ya que presenta un valor de $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, lo cual indica que la catalasa debe catalizar una reacción cada vez que se encuentra con una molécula de sustrato. La velocidad está limitada por la difusión del sustrato (10^8 a $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), por lo que esta enzima se ha considerado un catalizador perfecto. Otros ejemplos de enzimas que están limitadas por la difusión son la triosafosfato isomerasa, la fumarasa, la acetil colinesterasa, la anhidrasa carbónica y la diacilglicerol cinasa.

La CAT-1 presentó una cinética compleja en altas concentraciones de sustrato, ya que la V_{max} y la K_m son mayores que en concentraciones bajas (ver más adelante). Sin embargo, la eficiencia catalítica no cambió. Se ha reportado que la HPII y la CatR presentan una actividad mayor en altas concentraciones de sustrato en el ajuste con el modelo de Michaelis-Menten (14).

El fenómeno de resistencia al sustrato parece ser exclusivo de las catalasas con subunidades grandes. Ejemplos de ello son la CatR (5.0 M), la HPII (5.0 M) (14, 26, 69-70) y la CAT-3 (3.0 M) (Valdés, VJ., Díaz, A y Hansberg, W. Resultados sin publicar). En contraste con lo anterior, la catalasa bovina se inhibe reversiblemente y se inactiva irreversiblemente a partir de 200 mM de H_2O_2 (26). La catalasa de *Bacteroides fragilis* y la de *P. mirabilis* y otras 12 catalasas con subunidades pequeñas también se inhiben a partir de ≈ 200 mM de sustrato (14). La inhibición reversible de la BLC con el sustrato se debe a la acumulación del compuesto II y la inactivación a la acumulación del compuesto III (26). La resistencia a la inhibición por sustrato en las catalasas grandes está relacionada con una baja velocidad de formación de los compuestos II y III y una alta velocidad de conversión del compuesto III al estado inicial de la enzima comparada con las catalasas pequeñas (26).

II. Comparación estructural y funcional de la CAT-1a con la CAT-1e

a) Comparación estructural

Con el fin de probar si la CAT-1e presenta diferencias estructurales con la CAT-1a se realizaron ensayos de actividad y estabilidad en pH extremos. La CAT-1e resultó ser

menos activa que la CAT-1a en un pH extremo (de 4.0 a 4.5 y de 11.5 a 12.0) (Fig.11A) y menos estable en un pH ácido (de 4.0 a 6.0) (Fig. 11B). Lo anterior indica que hay un cambio estructural en la CAT-1 modificada que vuelve a la enzima menos estable en pH ácido.

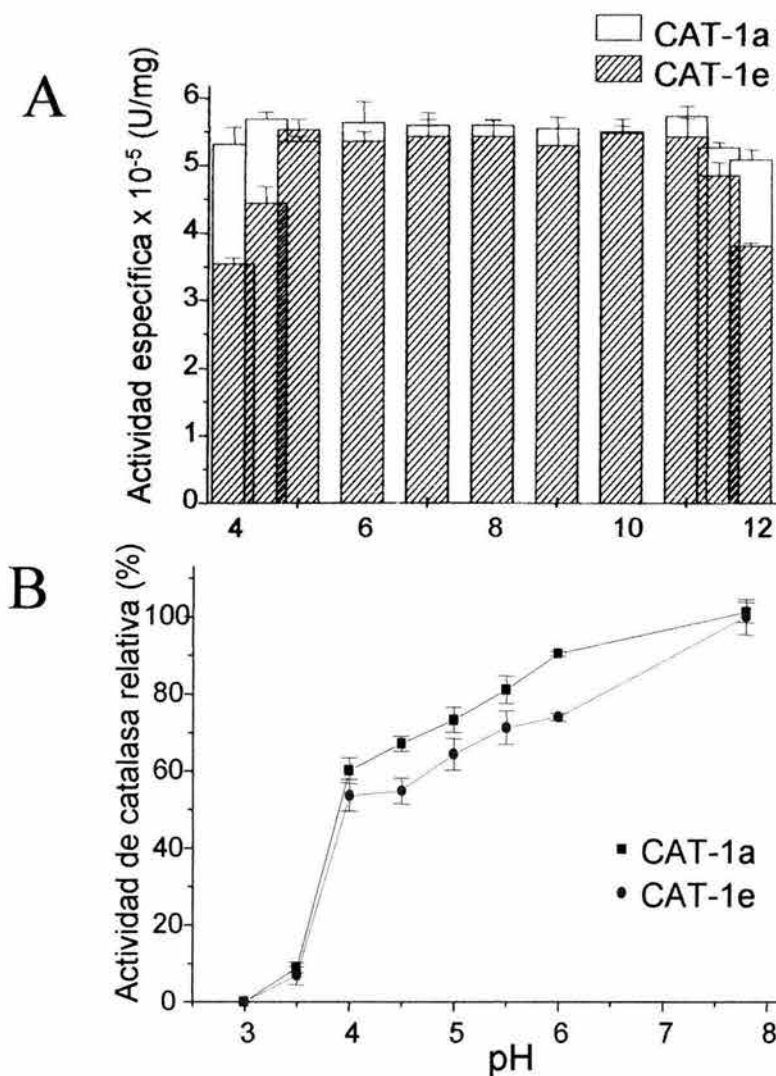


Fig. 11.- La actividad y la estabilidad de la CAT-1 en diferente pH. A. La actividad específica de la CAT-1a (Barras claras) y la CAT-1e (barras rayadas) en el pH indicado. B. La estabilidad de la CAT-1a (línea negra) y la CAT-1e (línea roja) en un intervalo de pH ácido. La actividad de la enzima en pH 7.8 se tomó como el 100%.

También se obtuvieron los espectros de emisión de la fluorescencia de la CAT-1. Ambas enzimas tienen un máximo de emisión en 334 nm y no presentaron diferencias en sus espectros. También se registraron los espectros de dicroísmo circular y se midió la proporción de cada estructura secundaria. Los resultados no detectaron diferencias

significativas entre la CAT-1a y la CAT-1e, lo cual indica que no hay cambios estructurales importantes en la proteína.

Debido a la oxidación por el oxígeno en singulete en el hemo (8), se analizó la fluorescencia del hemo de la CAT-1. Para ello se utilizaron altas concentraciones de la enzima (5 mg/ml) pues el Fe tiene una alta absorbencia. Los espectros de la emisión de fluorescencia del hemo se registraron con la CAT-1 recién purificada y después de una y ocho semanas de almacenamiento. Después de una semana la CAT-1 se oxidó parcialmente (CAT-1c) y después de ocho semanas se oxidó totalmente (CAT-1e). El hemo de la CAT-1 se excitó a 400 nm y la emisión de fluorescencia se registró en el intervalo de 420 y 700 nm. El espectro de la emisión de fluorescencia presentó picos en 465, 574-578, 615 y 642-646 nm con un hombro en 502-510 nm y un mínimo en 570, 600 y 630 nm. En la enzima CAT-1c hubo un incremento en la emisión de la fluorescencia de 560 a 700 nm y en la CAT-1e hubo un incremento de la fluorescencia entre 480 y 520 nm (Fig. 12). Estos resultados sugieren que hay un cambio estructural local cuando la CAT-1 se modifica por el oxígeno y que dicho cambio ocurre en más de un paso. Sin embargo, las diferencias detectadas en la emisión de la fluorescencia del hemo de la CAT-1 son bajas y no hay diferencias significativas en una región particular de los espectros. Aunque hay dos resultados reportados que apoyan la existencia de un cambio estructural en el hemo de la CAT-1e. El primer resultado muestra que el hemo de la CAT-1e, aislado y analizado en una cromatografía de fase reversa con una columna hidrofóbica, tiene una movilidad que sugiere que es ligeramente más hidrofóbico que el hemo de la CAT-1a (los tiempos de retención fueron de 31 min y 30.6 min para la CAT-1e y la CAT-1a, respectivamente). El segundo resultado muestra que el espectro de absorción del hemo de la CAT-1e tiene una asimetría mayor que el hemo de la CAT-1a. Los espectros de absorción del hemo de la CAT-1a y de la CAT-1e presentaron una longitud de onda de máxima absorción para el Soret de 369 nm y 363 nm respectivamente. El pico de Soret de la CAT-1a y de la CAT-1e cambia a 408 nm en presencia de imidazol, pero su absorbencia es menor, comparada con la hemina que cambia de 395 nm a 412 nm con imidazol. La CAT-1e en presencia de imidazol tuvo una absorbencia del pico de Soret menor que la CAT-1a. La proporción de absorbencia de los picos de Soret (+imidazol/-imidazol) fue de 1.45 para el hemo de la CAT-1a y de 2.65 para el de la CAT-1e, lo cual sugiere que la CAT-1a tiene un hemo

asimétrico y que la asimetría aumenta en el hemo de la CAT-1e (8). Los dos resultados anteriores apoyan la idea de que existe una modificación estructural en el hemo de la CAT-1 cuando interactúa con el oxígeno.

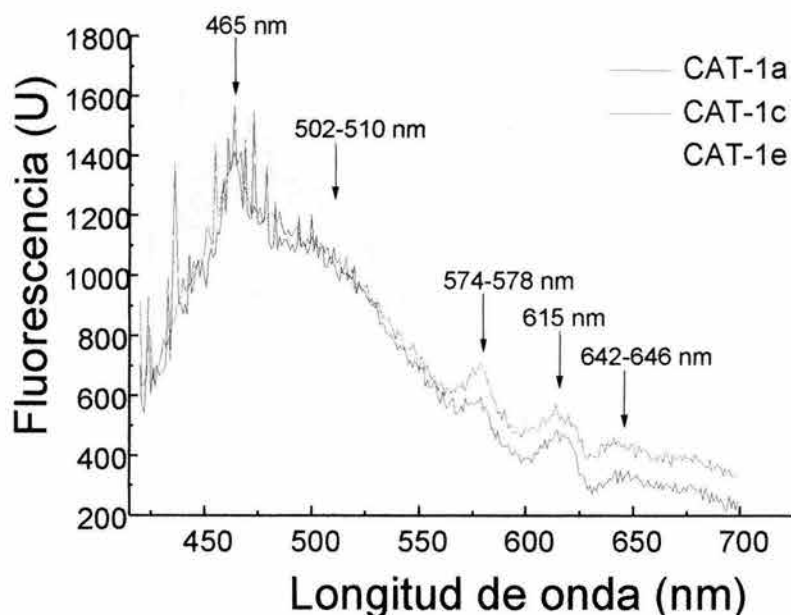


Fig. 12.- Diferencias en la emisión de fluorescencia de la CAT-1. La CAT-1 purificada en una concentración de 5 mg/ml se excitó a 400 nm y la emisión de la fluorescencia se registró de 420 a 700 nm (la línea azul es la CAT-1a). La fluorescencia se midió después de una semana (la línea rosa es la CAT-1c) y después de ocho semanas de almacenamiento (la línea azul cielo es la CAT-1e).

Para poner en evidencia los cambios estructurales locales, se probaron condiciones desnaturizantes como el efecto de la temperatura, el clorhidrato de guanidina y las proteasas. La CAT-1 incubada una hora en altas temperaturas (80 a 93°C), se separó mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes. La CAT-1e se disoció en monómeros a partir de los 85°C mientras que la CAT-1a lo hizo a temperaturas mayores de 90°C, indicando que la CAT-1a es más estable a altas temperaturas que la CAT-1e (Fig. 13A). La desnaturización por temperatura de la CAT-1 es similar a la HP11, ya que esta enzima se disocia en monómeros en temperaturas mayores a los 95°C si se incubó por 10 min (35).

La CAT-1a resultó ser más resistente que la CAT-1e al clorhidrato de guanidina. La CAT-1a mantuvo su actividad y se disoció sólo parcialmente en monómeros después de incubarla 48 h a una concentración de 4.0 M de clorhidrato de guanidina. En cambio, la CAT-1e, en las condiciones anteriores, se inactiva y se disocia totalmente en monómeros (Fig. 13B).

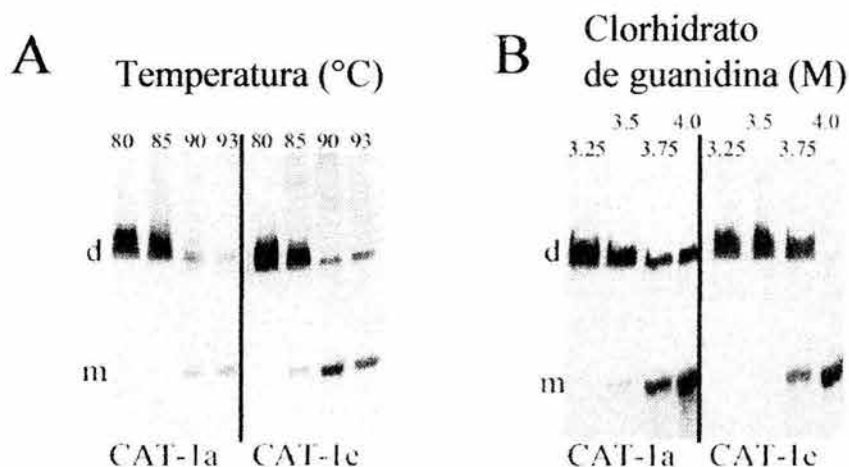


Fig. 13.- La estabilidad de la CAT-1 en altas temperaturas y concentraciones molares de clorhidrato de guanidina. A. La CAT-1a y la CAT-1e se incubaron a diferentes temperaturas y se analizaron en PAGE nativo. B. La CAT-1a y la CAT-1e se incubaron 48 h en diferentes concentraciones de clorhidrato de guanidina y se analizaron en PAGE nativo. d indica el dímero y m indica el monómero.

La CAT-1e es menos estable que la CAT-1a en altas temperaturas y al clorhidrato de guanidina (4 M). Lo anterior indica que los cambios producidos por la oxidación hacen a la enzima menos estable en condiciones extremas.

Como el oxígeno en singulete reacciona muy rápido con los aminoácidos, particularmente Trp, Tyr, His, Met, Cys y el hemo. También es probable que otros aminoácidos en la enzima resulten dañados. El daño puede ser heterogéneo y presentarse en un nivel bajo que dificulte su detección. Dicho daño en la enzima puede ser la causa del aumento en la inestabilidad de la CAT-1e.

Para probar si la CAT-1a y la CAT-1e presentan diferencias en la susceptibilidad a proteasas, se hizo un ensayo con subtilisina. La pérdida de la actividad de la CAT-1e mostró una cinética de primer orden y ocurrió más rápido que con la CAT-1a. La CAT-1e

perdió el 50% de su actividad en 2.76 h mientras que la CAT-1a lo hizo en 5.37 h (Fig. 14A). La CAT-1a y la CAT-1e, incubadas con subtilisina a diferentes tiempos, se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y PAGE nativos. En los geles se aprecian dos polipéptidos activos principales, uno de aproximadamente 63 kDa y otro de aproximadamente 49-51 kDa (Fig. 14B). La densitometría de la banda de 63 kDa coincidió prácticamente con la actividad de catalasa, lo cual indica que este polipéptido mantiene su actividad (Fig. 14C). Los resultados indican que la CAT-1e es más susceptible a la degradación con subtilisina que la CAT-1a. Existe la posibilidad de que la oxidación de la CAT-1 sea una señal de inicio para la degradación de la enzima.

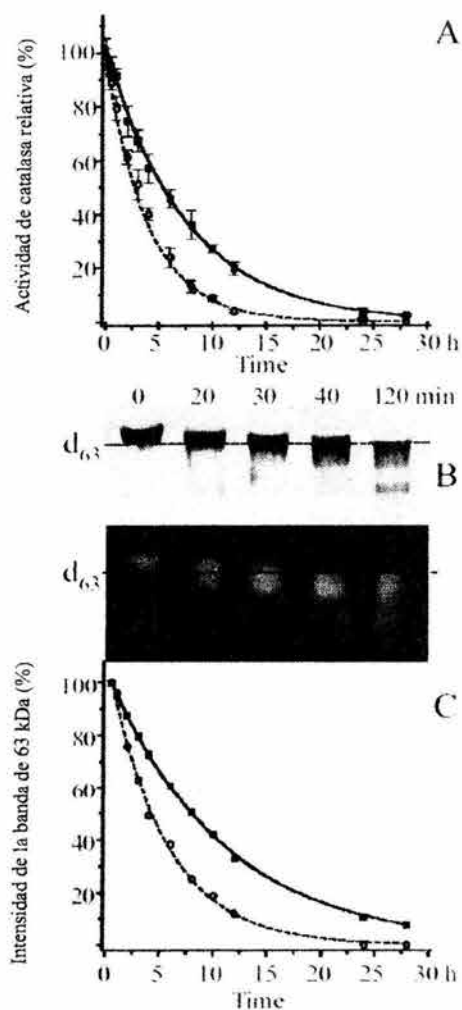


Fig. 14.- Proteólisis de la CAT-1 con subtilisina. La CAT-1a (línea continua) y la CAT-1e (línea cortada) se incubaron con subtilisina en diferentes tiempos y después se midió la actividad residual (A). Las mismas muestras se analizaron por PAGE nativo (B). Panel superior: gel teñido con azul brillante de Coomassie, panel inferior: zimograma. (C) La densitometría de la banda de 63 kDa.

Una explicación de por qué la CAT-1e es más susceptible a la degradación con subtilisina que la CAT-1a, si ambas enzimas tienen la misma secuencia de aminoácidos podría ser la siguiente: la CAT-1e modificada por el oxígeno puede tener mayor flexibilidad que la CAT-1a, de tal manera que la CAT-1e podría exponer más sitios de corte para la subtilisina que la CAT-1a. Sin embargo, podría haber otra explicación para la sensibilidad de la CAT-1e a la proteólisis con subtilisina.

b) Comparación funcional

Para conocer si hay diferencias desde el punto de vista funcional entre la CAT-1a y la CAT-1e se probaron inactivadores e inhibidores, se determinó la actividad en un intervalo amplio de concentraciones de H_2O_2 y se estimó la energía de activación de la catálisis.

La CAT-1 mostró una inhibición competitiva con cianuro. La CAT-1a presentó una constante de inhibición con cianuro K_i de $0.76 \pm 0.05 \mu M$ y la CAT-1e una de $0.28 \pm 0.03 \mu M$ (Fig. 15). Los valores de las constantes de inhibición indican que la CAT-1e es ligeramente más sensible a la inhibición con cianuro que la CAT-1a. Lo anterior probablemente esté relacionado con un cambio en el sitio activo en la CAT-1e, ya que el cianuro se coordina con el Fe del hemo (27). En la mutante N201H de la HP11, que contiene hemo *b* a menos que se incuba con un sistema generador de peróxido de hidrógeno, se midió la constante de disociación K_D con cianuro, los resultados indican que esta mutante es más afín al cianuro cuando contiene hemo *d* que cuando tiene hemo *b* (71). Los resultados anteriores indican que los cambios estructurales en el grupo hemo de la CAT-1 y la HP11 pueden modificar su sensibilidad al cianuro.

Otros inactivadores de catalasas, como el 3-amino-1,2,4-triazol, la azida y la hidroxilamina, no mostraron diferencias significativas entre la CAT-1a y la CAT-1e. La CAT-1a y la CAT-1e con el 3-amino-1,2,4-triazol tuvieron una constante de inactivación de pseudo-primer orden k de $0.054 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$ y de $0.052 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$, respectivamente. Los valores de las constantes de inactivación de segundo orden k con la azida fueron de $2.11 \pm 0.03 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para la CAT-1a y de $1.83 \pm 0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para la CAT-1e. Los valores de las constantes de inactivación de segundo orden k con la hidroxilamina fueron de $3.54 \pm 0.07 \mu M \text{ min}^{-1}$ para la CAT-1a y de $3.32 \pm 0.11 \mu M \text{ min}^{-1}$ para la CAT-1e.

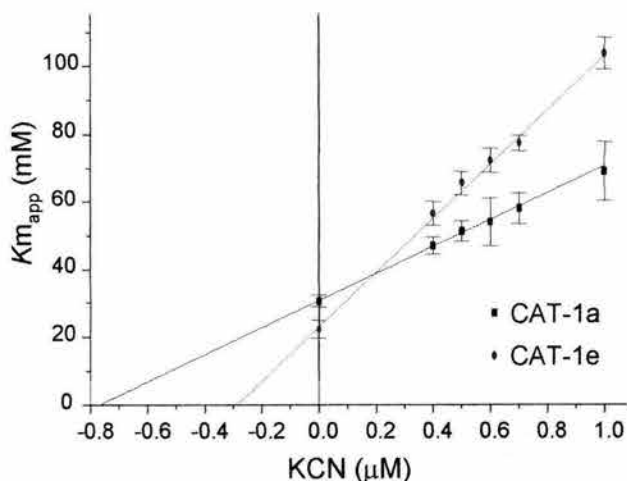


Fig. 15.- Sensibilidad a la inhibición con cianuro. El cianuro inhibe competitivamente a la CAT-1 con una K_i de $0.76 \mu\text{M}$ en el caso de la CAT-1a y $0.28 \mu\text{M}$ en el caso de la CAT-1e.

Al igual que la CAT-1a, la CAT-1e no se inhibió en concentraciones molares de sustrato. Los datos de la actividad de la CAT-1 con H_2O_2 mostraron que tiene una cinética compleja que hace que los valores de K_m y V_{\max} sean diferentes en concentraciones milimolares y molares de sustrato. Considerando lo anterior se hizo una nueva cinética con 36 concentraciones de sustrato en un intervalo entre 0.01 y 3.0 M. Los datos de la actividad de la CAT-1a y de CAT-1e, tanto en bajas como en altas concentraciones de sustrato, se ajustaron bien a un modelo de dos componentes (Fig. 16). El modelo de dos componentes es el resultado de la suma de dos ecuaciones de Hill: $v = \{V_{\max(1)}S^{n(1)}/(S_{0.5(1)}^{n(1)} + S^{n(1)})\} + \{V_{\max(2)}S^{n(2)}/(S_{0.5(2)}^{n(2)} + S^{n(2)})\}$. Con este modelo se obtuvo un mejor ajuste que con el modelo de Michaelis-Menten. Uno de los componentes está presente en bajas concentraciones de sustrato ($<100 \text{ mM}$) y el otro se observa en altas concentraciones de sustrato ($>250 \text{ mM}$). Ambos componentes pueden tener cooperatividad, el primero con una $n = 1.2$ y el segundo con una $n = 1.7$.

La CAT-1e presentó valores mayores en sus constantes $S_{0.5}$ (0.051 ± 0.006 y $0.81 \pm 0.054 \text{ M}$) respecto a la CAT-1a (0.021 ± 0.002 y $0.57 \pm 0.023 \text{ M}$). Sin embargo, los valores de las V_{\max} , las k_{cat} y las eficiencias catalíticas fueron similares (Tabla II), lo cual indica que, aunque la CAT-1e esté modificada por el oxígeno, mantiene su función aún en concentraciones molares de H_2O_2 . En la catalasa de espinaca se ha observado una cooperatividad con un número de Hill de 2.3 (72-73). Esta catalasa presenta dos tipos de grupos prostéticos, uno es el hemo *b* y el otro es probablemente una clorina como la

reportada para una catalasa de *N. crassa* (74), que posiblemente sea una mezcla de CAT-1 y CAT-3 (54). Una explicación similar se podría dar para la CAT-1, ya que, como se verá más adelante, en la estructura cristalográfica de la CAT-1 se encontraron dos tipos de grupos hemo: hemo *b* y hemo *d*. Sin embargo, tanto la CAT-1a como la CAT-1e presentan dos componentes similares, lo cual indica que la oxidación del hemo no tiene que ver con la cinética de dos componentes. Otro resultado que podría apoyar la cooperatividad en la catalasa es la estructura de la HP11 con H₂O₂. En esta estructura hay cambios conformacionales en algunos aminoácidos que se observan sólo en un dímero del tetrámero. Se propone que la ruptura de la simetría del tetrámero por la unión del H₂O₂ puede ser la consecuencia de cooperatividad entre las subunidades (33). La HP11 y la CatR también parecen presentar una cinética compleja, ya que sus actividades en altas concentraciones de sustrato no se ajustan bien al modelo de Michaelis-Menten (14).

Tabla II.- Constantes cinéticas de la CAT-1a y la CAT-1e.

| Enzyme Constant | CAT-1a | CAT-1e |
|--|---|---|
| V _{max [1]} (U/mg) | 2.04 x 10 ⁶ ± 6.4 x 10 ⁴ | 2.15 x 10 ⁶ ± 1.1 x 10 ⁵ |
| S _{0.5 [1]} (M) | 0.021 ± 0.002 | 0.051 ± 0.006 |
| V _{max [2]} (U/mg) | 3.4 x 10 ⁶ ± 6.7 x 10 ⁴ | 3.26 x 10 ⁶ ± 1.1 x 10 ⁵ |
| S _{0.5 [2]} (M) | 0.57 ± 0.023 | 0.81 ± 0.054 |
| k _{cat [1]} (s ⁻¹) | 1.12 x 10 ⁷ | 1.18 x 10 ⁷ |
| k _{cat [1]} /S _{0.5 [1]} (M ⁻¹ s ⁻¹) | 5.32 x 10 ⁸ | 2.31 x 10 ⁸ |
| k _{cat [2]} (s ⁻¹) | 1.86 x 10 ⁷ | 1.78 x 10 ⁷ |
| k _{cat [2]} /S _{0.5 [2]} (M ⁻¹ s ⁻¹) | 3.26 x 10 ⁷ | 2.20 x 10 ⁷ |

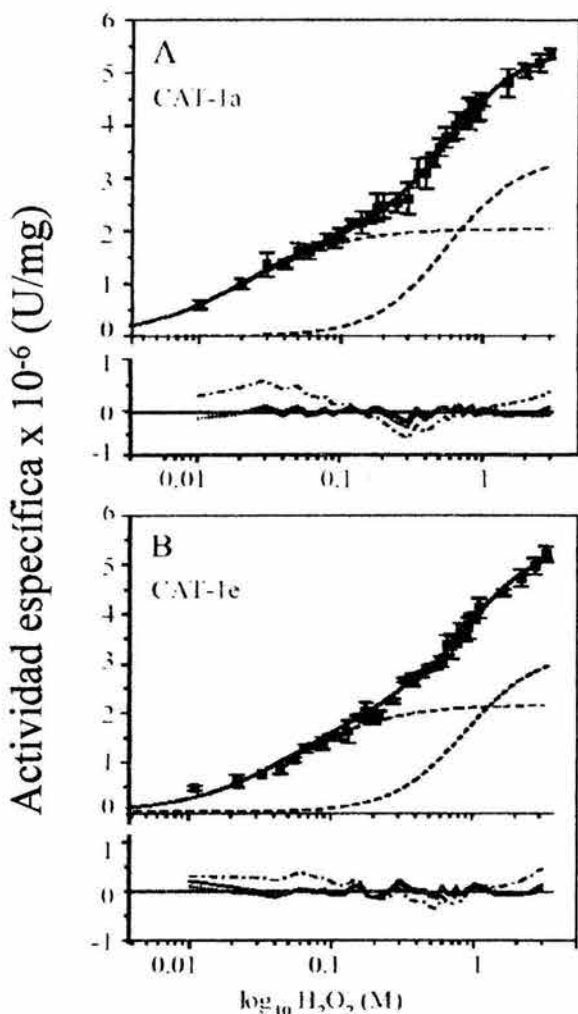


Fig. 16.- Cinética de la CAT-1. A. Cinética de la CAT-1a. B. Cinética de la CAT-1e. Línea continua: ajuste de los datos a la ecuación de Hill de dos componentes con números de Hill de 1.2 y 1.7. Línea cortada: cuevas teóricas para cada componente. Abajo de cada gráfica están los residuales del ajuste de los datos a tres ecuaciones: líneas continuas, la ecuación de Hill con dos componentes con números de Hill de 1.2 y 1.7 para el primer y segundo componente, respectivamente; líneas de puntos, la ecuación de los dos componentes sin cooperatividad; líneas de punto y raya, la ecuación de Michaelis-Menten.

La energía de activación de la CAT-1 se estimó haciendo una gráfica de Arrhenius. Los datos de la actividad entre 15 y 35°C se ajustaron al modelo de los dos componentes. Las energías de activación de la CAT-1a fueron de $Ea_1 = 19.6 \pm 1.5$ y $Ea_2 = 17.5 \pm 6.2$ Kcal/mol y para la CAT-1e fueron de $Ea_1 = 16.7 \pm 2.3$ y $Ea_2 = 21.1 \pm 3.6$ Kcal/mol. Las energías de activación de la CAT-1a y la CAT-1e no tienen diferencias significativas, lo cual indica que la oxidación de la CAT-1 por el oxígeno no modifica su catálisis. No hay valores de Ea de la catálisis reportados para comparar los valores de Ea de k_{cat} de la CAT-1. Sin embargo, hay valores reportados de Ea aparente de la unión del sustrato. Los dos valores de Ea aparente de la unión del sustrato reportados en catalasas de hongos se determinaron: 1) a partir de la velocidad inicial obtenida a una sola concentración de H_2O_2

(14 mM) para una catalasa de *N. crassa* y 2) usando metil hidroperóxido como sustrato para la CatR de *A. niger* (formación del compuesto I) (74-75). La CAT-1a tuvo valores de E_a de unión del sustrato de 4.2-6.8 Kcal/mol y la CAT-1e de 4.5-5.5 Kcal/mol. Comparando estos valores con el reportado para una catalasa de *N. crassa* (74), la E_a de 7.2 Kcal/mol resulta similar, y para la CatR de *A. niger* la E_a de 2.6 Kcal/mol es menor (75).

Las evidencias presentadas indican que la CAT-1e es estructural y funcionalmente diferente a la CAT-1a. Sin embargo, las diferencias sólo se detectaron en condiciones extremas. Bajo condiciones fisiológicas ambas enzimas son funcionalmente equivalentes.

A continuación se resumen los resultados y la discusión del tercer y último trabajo.

III. La estructura cristalográfica de la CAT-1

a) La determinación de la estructura

La estructura cristalográfica de la CAT-1 se determinó por reemplazo molecular con la catalasa HP11 como modelo inicial. La resolución fue de 1.75 Å. Al caracterizar el cristal se obtuvo como grupo espacial el monoclinico C2 y la unidad asimétrica fue un dímero. Las dimensiones de la celda fueron las siguientes: $a = 130.00 \text{ \AA}$, $b = 182.24 \text{ \AA}$, $c = 90.36 \text{ \AA}$ y $\beta = 133.41^\circ$. En el modelo final se obtuvieron valores de R_{cryst} y R_{free} de 18.3 y de 20.6, respectivamente. Los parámetros cristalográficos y la estadística del afinamiento se muestran en la Tabla III. La densidad electrónica de la CAT-1 en ambos monómeros está bien definida a partir del aminoácido 39. La secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal indica que la proteína se procesa, pues no contiene los primeros 21 aminoácidos. En el extremo N-terminal no se detecta una secuencia de péptido señal, como en la CAT-3, que es una enzima que se secreta (54). Sin embargo, sabemos por inmunodetección que la CAT-1 se localiza parcialmente en la pared celular de los conidios. Es posible que la secuencia de los 21 aminoácidos contenga una señal para la exportación hacia la pared celular. Los siguientes 17 aminoácidos en el modelo no se observan, probablemente porque esta región es muy flexible. Algo similar ocurre en la HP11, en la cual no se observan los primeros 26 aminoácidos (38-39). En la SCCA de *S. cerevisiae* tampoco se detectan los primeros 14 aminoácidos en los mapas de densidad electrónica (10).

Tabla III.- Parámetros cristalográficos y estadística del afinamiento.

| | |
|--|---------------------------|
| A. Parámetros | |
| Celda unitaria | |
| a (Å) | 130.00 |
| b (Å) | 182.24 |
| c (Å) | 90.36 |
| β (deg.) | 133.41 |
| Resolución (Å) | 15.0 - 1.75 (1.86 - 1.75) |
| Reflexiones únicas | 153 020 |
| Totalidad de los datos (%) | 89 (89.8) |
| R_{sym} (%) | 5.9 (32.6) |
| I/σ | 8.6 (2.3) |
| Multiplidad | 2.4 (2.3) |
| Mosaicidad | 0.9 |
| B. Afinamiento | |
| Limites de resolución(Å) | 15.0 - 1.75 |
| R_{crist} (%) | 18.3 |
| R_{free} (%) | 20.6 |
| Átomos de la proteína | 11 050 |
| Átomos del hemo | 174 |
| Átomos del solvente | 1 725 |
| Distancia de enlace (Å) | 0.008 |
| Ángulos de enlace (deg.) | 1.40 |
| C. Factores B promedio (Å ²) | |
| Proteína | 18.41 |
| Hemo | 9.60 |
| Solvente | 38.61 |

Casi todos los aminoácidos de la CAT-1 (99.7%) tienen una geometría excelente en su cadena principal, excepto dos de ellos, la Val238 y la His720, que están en regiones no permitidas en la gráfica de Ramachandran. La Val238 de la CAT-1 es equivalente estructuralmente a la Ser216 en la BLC, la Ser202 en la MLC, la Ser217 en la HEC, la Ser196 en la PMC, la Ile274 en la catalasa HP11, la Val219 en la CatF de *P. syringae* que también están en regiones no permitidas. Lo anterior probablemente se debe a que la primera parte de la $\beta 5$ sólo hace puentes de hidrógeno con la $\beta 4$ y la segunda parte de la $\beta 5$ sólo los hace con la $\beta 6$ y este aminoácido, junto con otros dos cercanos, forman esta transición. Además, dichos aminoácidos también participan en la orientación del hemo. La Val238 forma parte del canal lateral de la CAT-1 (ver más adelante) pero no se conoce su función. En la PMC la Ser196 se ha propuesto como parte del posible camino de electrones del NADPH hacia el hemo (43). La His720 de la CAT-1 es equivalente a la His739 de la HP11, que también está en regiones no permitidas. La conformación desfavorable de la

His720 se puede explicar en parte porque el grupo imidazol de la His720 forma puentes de hidrógeno con el grupo guanidino de la Arg556, con el carbonilo de la Ser265 y con dos moléculas de agua. Lo mismo ocurre con la His739 en la HP11 (39). No se conoce una función para la His720 pero podría participar en la unión de nucleótidos o RNA, ya que forma parte del dominio del extremo C-terminal que es semejante a la flavodoxina.

b) La estructura de la CAT-1

La CAT-1 como otras catalasas es un tetrámero con simetría molecular 222 y como la HP11 y la PVC, no une NADPH. El monómero de la CAT-1 presenta cinco dominios: 1) el extremo N-terminal (Ser22 a Val91), 2) el barril β con ocho hebras β antiparalelas (His92 a Ala354), 3) el asa envolvente (Phe355 a His464), 4) el dominio de las hélices (Phe465 a Gly523) y 5) el dominio en el extremo C-terminal que es semejante a la flavodoxina (Ser555 a Tyr736). El asa Glu524 a Lys554 une el dominio de las hélices con el extremo C-terminal (Fig. 17A).

De las 39 prolinas que tiene la CAT-1, dos están en conformación *cis*: la Pro194 y la Pro425. La Pro 425, ubicada en la mitad del asa envolvente, está conservada en secuencia y conformación en las estructuras de otras catalasas, excepto en la SCCA. Se piensa que la Pro 425 desempeña un papel en la organización del tetrámero (15). La Pro194, localizada en el asa que une la α_3 con la α_4 del dominio del barril β , es equivalente a la Pro230 de la HP11, que también está en conformación *cis* (38-39). La Pro 194 probablemente esté en conformación *cis* para evitar interacciones desfavorables con la cadena lateral del Asp280 en el tetrámero.

El dominio del extremo N-terminal comprende desde el primer aminoácido hasta el residuo de His92 que es esencial para la catálisis. Esta región tiene 70 aminoácidos y contiene la hélice α_2 (Asp71-His83), que es el primer elemento de estructura secundaria común en las catalasas. No sabemos si la CAT-1 presenta la α_1 como, por ejemplo, la HP11, la HEC y la BLC, ya que los aminoácidos correspondientes no se observan en la estructura. En las estructuras de la HP11 y la SCCA los factores B para los primeros aminoácidos del extremo N-terminal son mayores a 30 \AA^2 , lo cual indica que el N-terminal es una región flexible.

El barril β con ocho hebras antiparalelas es el dominio más conservado de las catalasas. Es una estructura $\alpha+\beta$ de 263 aminoácidos. El barril β es el dominio del hemo. Las primeras cuatro hebras (β 1-4) son consecutivas y están separadas por tres hélices (α 3-5) del segundo grupo de cuatro hebras (β 5-8). La primera mitad del barril β contiene la His92 y la Asn165, que son aminoácidos esenciales del sitio activo. La hebra β 5 está interrumpida por los tres aminoácidos (Val238, Asn239 y Thr240) que no participan en la hoja β . Entre las hebras β 6 y β 7 hay dos hélices (α 6 y α 7). La última hélice, α 8, del dominio del barril β , cerca de la β 8, es una hélice tipo π (Glu345 a Thr350) como ocurre en la PVC (42) y la BLC (41) y, posiblemente, en todas las otras estructuras de catalasa.

El asa envolvente abarca 110 aminoácidos que unen el barril β con el dominio de las hélices. Esta región contiene la hélice (α 9) con la Tyr379 esencial, que es el aminoácido que coordina el Fe del hemo. Este dominio, junto con el extremo N-terminal, participa en la dimerización entre dos subunidades relacionadas en el eje Q.

El dominio de las hélices, con 59 aminoácidos, está formado por cuatro hélices contiguas (α 10-13) como en las demás catalasas. La α 10 y la α 12 forman el sitio de unión del NADPH en las catalasas pequeñas del clado III.

El dominio del extremo C-terminal, de 182 aminoácidos, es un dominio del tipo α/β formado por ocho hélices α (α 15-19') y nueve hebras β (β 9-17) cuya topología es semejante a la flavodoxina. En la CAT-1 este dominio es más grande que en la HP11 y la PVC (28 y 24 aminoácidos más respectivamente). La diferencia se debe principalmente a dos "inserciones" de 11 y 14 aminoácidos en la CAT-1. La PVC tiene una inserción de 16 aminoácidos. No se conoce la función del dominio del extremo C-terminal y no hay evidencia experimental de que pueda unir nucleótidos.

La dimerización en la CAT-1, como en todas las catalasas monofuncionales, es por el enganche mutuo de dos monómeros relacionados en el eje Q. El extremo N-terminal de un monómero se entrelaza como un gancho con el asa envolvente del otro y viceversa (Fig. 17B). El tetrámero es un dímero de dímeros, que tiene una estructura muy compacta con dimensiones de 145 x 92 x 84 Å (Fig. 17C). El entrelazado de dos subunidades en las catalasas es una característica única entre las enzimas que, al parecer, le confiere

estabilidad y contribuye a que las catalasas sean muy resistentes a las condiciones desnaturalizantes (39).

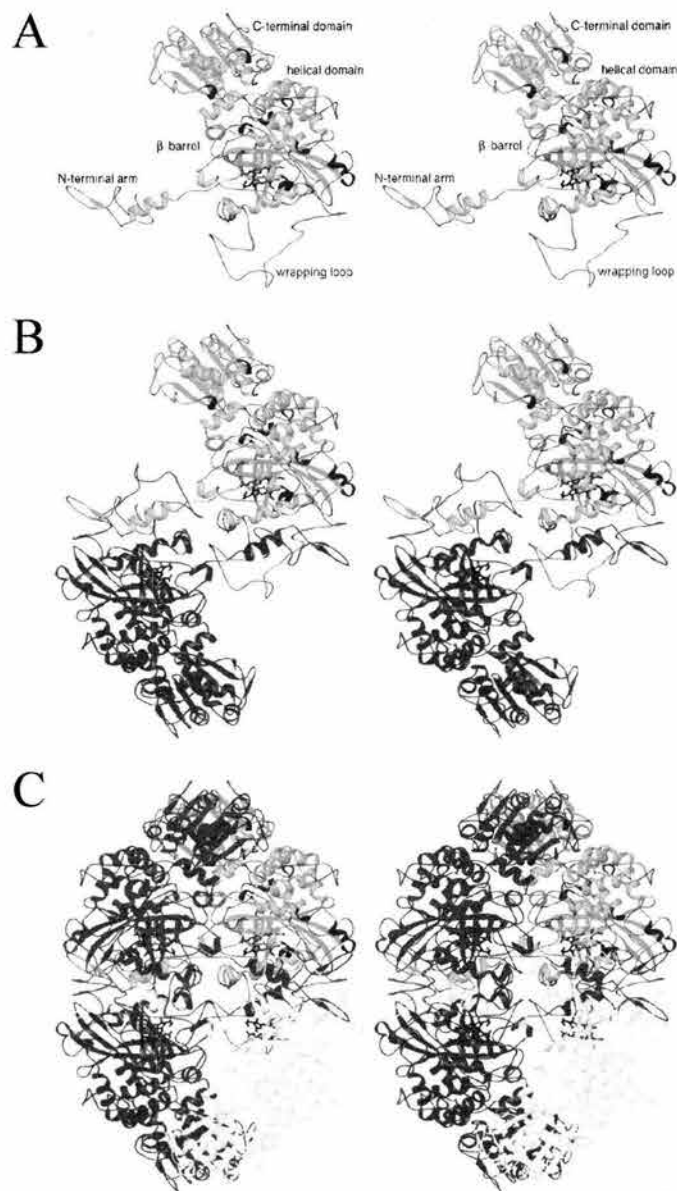


Fig. 17.- La estructura de la CAT-1 en estéreo. A. El monómero de la CAT-1 con las hebras β en color verde, las hélices α en azul, las hélices 3_{10} en azul marino y las asas en naranja. El hemo se muestra en color rojo. B. El dímero con un monómero mostrado como en A y el monómero relacionado en el eje Q en color azul. C. El tetramero de la CAT-1 con un dímero mostrado como en B y el otro con un monómero en amarillo y el otro en morado.

c) El sitio activo y el hemo

El hemo se encuentra entre el barril β y las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 9$. Los grupos propionato del hemo están enterrados y estabilizados por puentes salinos con tres argininas (Arg89, Arg129 y Arg386). Se ha propuesto que los puentes salinos de los propionatos del hemo

con las tres argininas ayudan a aumentar el potencial redox del compuesto I. Dichas argininas están conservadas en las catalasas de bacterias, hongos, plantas y animales (27).

El hemo de la CAT-1, al igual que el de la HP11, la PVC y la CatF, tiene una orientación His-IV, es decir, está rotado 180° respecto al hemo de las catalasas pequeñas del clado III. En la CatF se propone que la Leu350 y la Ala301 pueden determinar la orientación del hemo, ya que generan un impedimento estérico con los grupos vinilo y metilo del anillo I del hemo (30). En la CAT-1 no hay tal impedimento estérico y bien podría aceptar el hemo con la otra orientación.

En el sitio activo hay tres aminoácidos esenciales involucrados en la actividad catalítica: la His92 y la Asn165 en el lado distal y la Tyr379 en el lado proximal del hemo. El oxígeno de la Tyr379 esencial se coordina con el FeIII del hemo. El FeIII está 0.3 Å fuera del plano del hemo hacia el oxígeno de la Tyr379, el cuál está a 2.0 Å del FeIII. El lado distal de la cavidad del hemo es muy hidrofóbico y tiene varias fenilalaninas conservadas (Phe170, Phe178 y también la Phe81 de la subunidad relacionada en R) y los aminoácidos Val91, Val133, Leu134, Val146, Phe171, Ala220 y Phe488 principalmente (Fig. 18A). El aminoácido hidrofóbico en el lado distal del hemo que precede a la histidina esencial, es una valina en la CAT-1, al igual que en PVC, BLC, HP11, SCCA y HEC. En la PMC el aminoácido correspondiente es una metionina que está oxidada en metionina sulfona, la cual impide el acceso de algunos sustratos grandes al sitio activo (37). En la SCCA una mutación en dicha valina (V111A) reduce la actividad de catalasa e incrementa la actividad de peroxidasa para los sustratos grandes (10).

El hemo de la CAT-1 resultó ser una mezcla del hemo *b* con el hemo *d*. La proporción de estos hemos es de 57 y 43% respectivamente. Las dos subunidades de la CAT-1 presentan la mezcla de los grupos hemo. Los tipos de hemo encontrados en la CAT-1 sugieren que originalmente la enzima tiene hemo *b*, el cual se transforma en hemo *d* (Fig. 18B).

Como el hemo de la CAT-1 se oxida rápidamente por el oxígeno en singulete (8, 53), es probable que el hemo *d* se forme por una reacción con el oxígeno en singulete. El oxígeno en singulete se puede formar ocasionalmente como un producto de la actividad enzimática de la catalasa. Las mutantes inactivas de la HP11 no forman dióxígeno y el hemo no se oxida, indicando que el dióxígeno catalítico es el que oxida al hemo (32, 43). Las

porfirinas se excitan con la luz azul y el oxígeno puede absorber esta energía para formar oxígeno en singulete. Muchas catalasas pequeñas son fotoinactivadas. En contraste, la CAT-1 es muy resistente a la fotoinactivación (8).

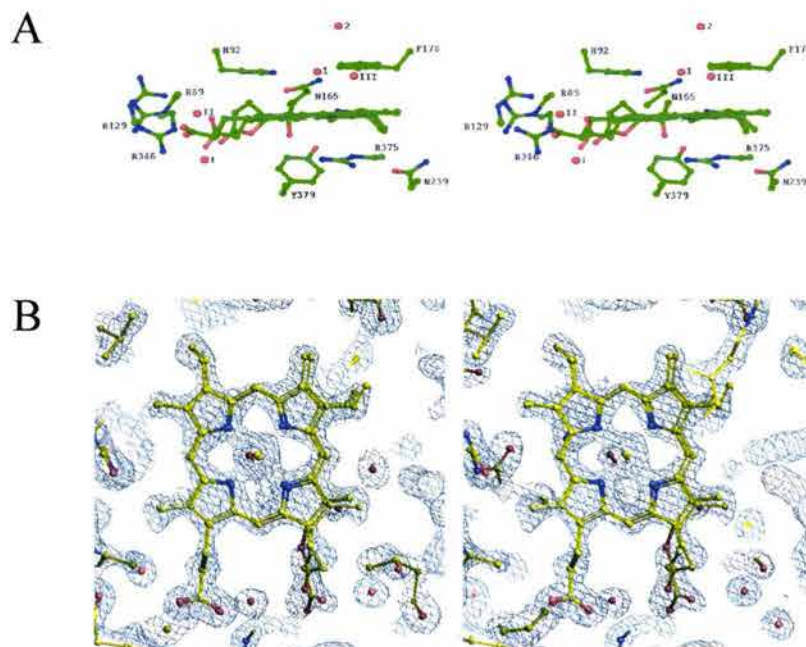


Fig. 18.- El sitio activo de la CAT-1. A. Lado proximal y distal del sitio activo en una vista lateral. Los aminoácidos y las moléculas de agua conservados están indicados. B. El hemo de la CAT-1 parcialmente oxidado (hemo *b* y hemo *d*) con el mapa de densidad electrónica 2fo-fc con un σ de 1.6.

Se ha observado la conversión del hemo *b* en hemo *d* en presencia del H_2O_2 en la mutante de la HP11 N201H (33). Existen otras mutantes (H128A, H128N, V169C, H392Q, H392A, H392D, D181A, D181S, D181Q y D181I) de la HP11 que tienen hemo *b*. Estas mutantes son inactivas o poco activas (5-15% de actividad respecto a la enzima nativa), lo cual apoya la idea que es el oxígeno la especie que modifica al hemo. La mutante inactiva H392E tiene una mezcla de hemo *b* e isómeros *cis* y *trans* de hemo *d*, lo cual sugiere un papel para esta histidina en la conversión del hemo. La sustitución de los aminoácidos que interactúan con el hemo, la Gln419 y la Ser414, también afecta la proporción *cis:trans* de la espirolactona en el hemo *d* en la HP11 (32, 76).

En las catalasas hay tres moléculas de agua que están relacionadas con el hemo o con los aminoácidos del sitio activo (30). Estas moléculas de agua se han denominado WI a WIII. En la CAT-1 la WI y la WII interactúan con los propionatos en el lado proximal y distal, respectivamente y la WIII interactúa con los carbonilos de la Val169 y la Ile167 (Fig.18A).

d) Un enlace covalente inusual Cys-Tyr

La CAT-1 presenta un enlace covalente inusual Cys-Tyr. El enlace se forma entre el azufre de la Cys356 y el C β de la Tyr379 que coordina el Fe del hemo (Fig. 19). El enlace Cys-Tyr está presente en las cuatro subunidades de la CAT-1. La densidad electrónica, la geometría tetraédrica y la distancia (1.9 Å) apoyan la existencia de este enlace covalente Cys-Tyr.

Para confirmar bioquímicamente dicho enlace en la CAT-1, la enzima se digirió con tripsina y los péptidos resultantes se analizaron por espectrometría de masas. La masa teórica de los dos péptidos unidos es de 5,154.4, que corresponde a la masa del péptido con la Tyr379 (3,778.8) y el de la Cys356 (1,377.6). Se detectó por espectrometría de masas un péptido con una masa molecular de 5,154, comprobando así la existencia del enlace covalente Cys-Tyr (Fig. 20).

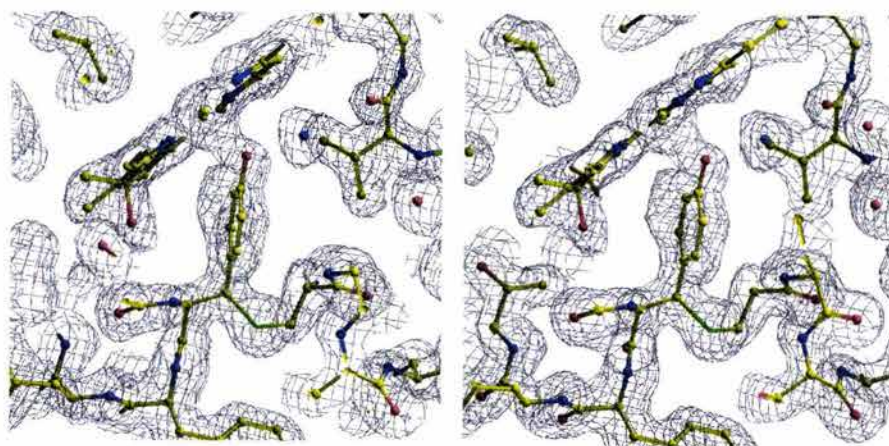


Fig. 19.- Un enlace covalente inusual en la estructura de la CAT-1. El enlace covalente es entre el azufre de la Cys356 y el C β de la Tyr379. Se muestra el mapa de densidad electrónica 2fo-fc con un σ de 1.0.

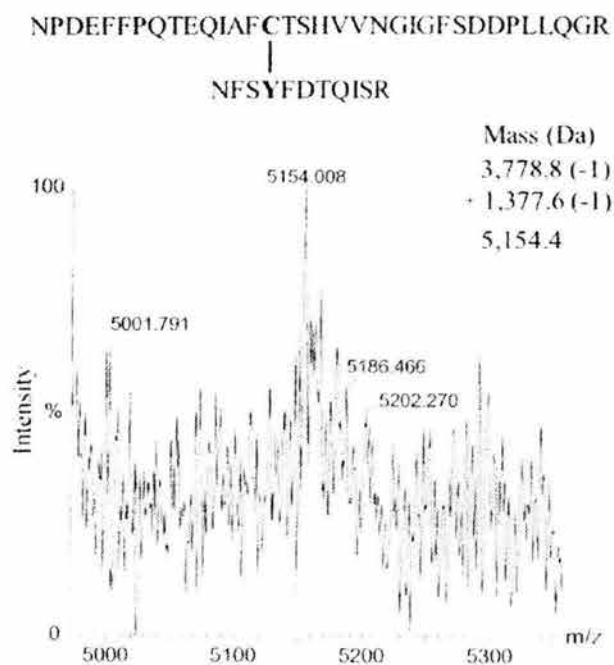


Fig. 20.- Espectrometría de masas de los péptidos de la CAT-1 obtenidos de una digestión con tripsina. Un péptido con una masa de 5, 154 comprueba el enlace entre el péptido que contiene la Cys356 (1, 377.6) y el péptido con la Tyr379 (3, 778.8).

Un posible mecanismo de formación del enlace covalente Cys-Tyr es el siguiente. La Tyr379 dona un electrón al compuesto I para formar el compuesto II y un radical catiónico de tirosina. El radical de tirosina se estabiliza en el anillo por migración entre los átomos C2, C4 y C6. La carga positiva parcial en C4 induce la desprotonación del tiol vecino de la Cys356 y el radical de tirosina es reducido por el tiol. El radical tiilo formado induce la desprotonación del C β de la tirosina y la formación del enlace covalente. El radical aniónico generado migra a la Fe-porfirina para formar el compuesto II (Fig. 21). Los dos electrones originados con las dos desprotonaciones son eliminados como superóxido, liberados por la descomposición del compuesto III que se forma por la reacción del compuesto II con el H₂O₂ (26).

La Tyr379 unida covalentemente a la Cys356 tendría menor probabilidad de donar electrones al compuesto I para formar el compuesto II (25). Así, la enzima difícilmente se inactivaría por sustrato. Como se ha visto anteriormente, la CAT-1 no se inactiva en concentraciones molares de H₂O₂.

El enlace covalente Cys-Tyr de la CAT-1 es equivalente al encontrado en la HPII. En este caso, el enlace es entre el N δ del imidazol de la His392 y el C β de la Tyr415 que se

coordina con el Fe del hemo (39, 44). La mutante N201H de la HPII presenta el enlace His-Tyr y el hemo *b*, lo que sugiere que la modificación del hemo y la formación del enlace covalente están desacopladas. Se ha propuesto que el compuesto I actúa como iniciador de estas reacciones (33). Sin embargo, el mecanismo de formación del enlace covalente His-Tyr se propone acoplado a la modificación del hemo. El mecanismo inicia con el compuesto I y se propone que se forman radicales libres que dan lugar a un reacomodo de electrones (44).

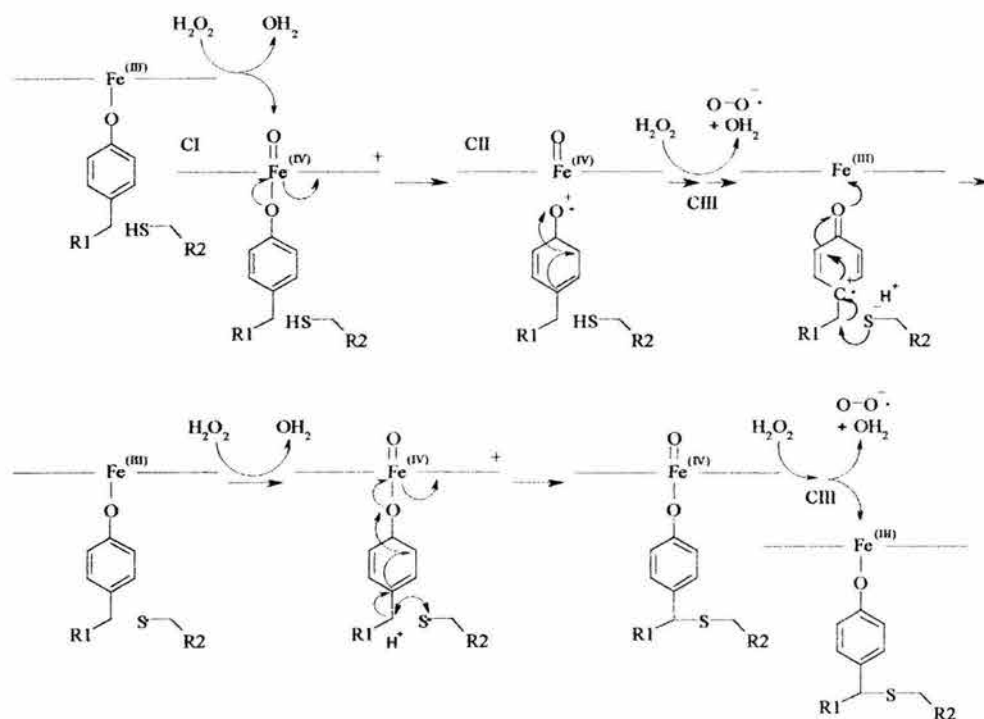


Fig. 21.- Mecanismo propuesto para la formación del enlace covalente Cys-Tyr. Un radical catiónico de tirosina se reduce por la Cys356 vecina formando un radical tiilo que induce la desprotonación del C β de la Tyr379 y la formación del enlace covalente.

La presencia de los enlaces covalentes inusuales con la tirosina parecen ser exclusivos de las catalasas grandes, pues no se ha observado en las catalasas pequeñas. El enlace His-Tyr en la HPII no participa en la resistencia de la enzima a la desnaturalización, ya que una mutante sin el enlace covalente es igual de resistente a la desnaturalización que la enzima nativa (35). En la HPII se propone que el enlace podría introducir cierta rigidez

en el sitio activo y facilitar el movimiento de electrones (44). Como las catalasas grandes no unen NADPH que tiende a evitar la formación de los compuestos II y III inactivos, el enlace con la tirosina de la CAT-1 y de la HP11 podría proporcionar un mecanismo alternativo para evitar la formación de los compuestos II y III. La PVC no presenta un enlace covalente inusual con la tirosina esencial aunque tiene subunidades grandes. El aminoácido equivalente a la Cys356 de CAT-1 y la His392 de la HP11 es el Glu327 en la PVC, pero no se sabe si esta enzima forma los compuestos II y III. La CAT-3 de *N. crassa* y la CatR tienen en esa posición una glutamina y no sabemos si forman un enlace covalente con la tirosina. La CAT-3 también es resistente a concentraciones altas de peróxido de hidrógeno (Valdés, VJ., Díaz, A y Hansberg, W. Resultados sin publicar).

e) Los canales de la CAT-1 y su posible función

Las catalasas tienen cuatro canales conservados que llegan al sitio activo. El primero es el canal principal, que en la CAT-1 tiene 31 Å de largo (Fig. 22). Éste es un canal hidrofóbico por donde llega el sustrato al sitio activo. El canal principal está formado por 14 moléculas de agua continuas, 10 son de la misma subunidad y cuatro son de la subunidad relacionada en el eje R. El oxígeno del hidroxilo de la Ser198 está orientado hacia el canal principal y tiene una distancia de 4.8 Å con el oxígeno del carbonilo de la Arg144. Como el H₂O₂ tiene 3.7 Å de ancho y el radio para cada hidroxilo es de 2.3 Å, no hay suficiente espacio para que una molécula de H₂O₂ pase por ese estrecho. La Ser198 podría actuar como una puerta de la parte estrecha del canal que conduce al sitio activo. Este aminoácido está conservado o sustituido por una treonina en todas las catalasas grandes, lo cual indica que el hidroxilo de estos aminoácidos puede tener una función importante.

Los análisis realizados en la HP11 indican que existe una diferencia de potencial eléctrico en el canal principal. La diferencia de potencial es entre la cadena lateral del aspartato (o glutamato en algunas mutantes) cargado negativamente en la posición 181 y el Fe del hemo cargado positivamente que están a 12 Å de distancia. Se propone que el potencial eléctrico orienta las moléculas de H₂O₂, favoreciendo su interacción con los aminoácidos del sitio activo, contribuyendo así a la catálisis de la enzima (76). El ácido

aspártico es uno de los aminoácidos conservados en el canal principal, de tal manera que la diferencia de potencial estaría presente en todas las catalasas.

El segundo canal es el canal que llega lateralmente a la parte proximal del hemo (Fig. 22). Este canal tiene aproximadamente 35 Å de largo en la CAT-1 y los aminoácidos que lo forman son principalmente hidrofóbicos. Presenta 12 moléculas de agua continuas que pertenecen a la misma subunidad. Se ha propuesto que el papel del canal lateral está relacionado con el NADPH en la BLC, pero debe tener un papel diferente en las catalasas con subunidades grandes, las cuales no unen el dinucleótido. En la HP11, el canal lateral se encuentra interrumpido por la Arg260 que hace un puente salino con el Glu270. Algunos resultados apoyan que el canal lateral en la HP11 puede ser un acceso al sitio activo, ya que la mutante R260A es más activa que la enzima silvestre y también es más sensible a inhibidores voluminosos (el cianuro, la azida y los derivados de la hidroxilamina) (70). El agua producida en la reacción de la catalasa podría salir por el canal lateral.

El tercer canal es el canal que conduce a la cavidad central del tetrámero (Fig. 22). Este canal tiene 15 Å de largo y los aminoácidos que lo forman son en su mayoría hidrofílicos. Tiene seis moléculas de agua continuas, tres son de la misma subunidad y las otras tres de la subunidad relacionada en el eje R. Debido a la alta eficiencia catalítica de la CAT-1, en altas concentraciones de sustrato, la gran cantidad de productos (H_2O y O_2) necesitan ser liberados del sitio activo y de la proteína. Lo anterior se puede hacer parcialmente a través del canal principal, pero este canal es muy estrecho como para permitir una liberación eficiente de los productos a esas altas concentraciones de sustrato. El canal central hidrofílico podría ser la salida del oxígeno producido en el sitio activo. Hay que resaltar que el canal central inicia en el anillo pirrólico III, que es el sitio de oxidación de las catalasas grandes. Por lo anterior, proponemos que en la CAT-1 y en otras catalasas grandes el O_2 (y el O_2 en singulete) sale principalmente por el canal central.

El cuarto canal es el canal menor, de 51 Å de largo, que está parcialmente interrumpido. Este canal inicia en el mismo sitio que el lateral y desemboca en el canal principal. Una posible función para este canal podría ser drenar el agua que se produce en el sitio activo y que sale por el canal principal, evitando así, la interferencia del agua con el sustrato que llega por el canal principal.

La presencia de los cuatro canales en las catalasas sugiere un modelo, en el cual un canal sería usado para la llegada del sustrato (canal principal) y los otros dos para la salida de los productos (canal lateral y central). Estos canales evitarían la interferencia del sustrato y los productos que se requiere cuando el número de recambio es elevado de 10^5 a 10^8 por segundo en concentraciones altas de H_2O_2 (39, 70, 77).

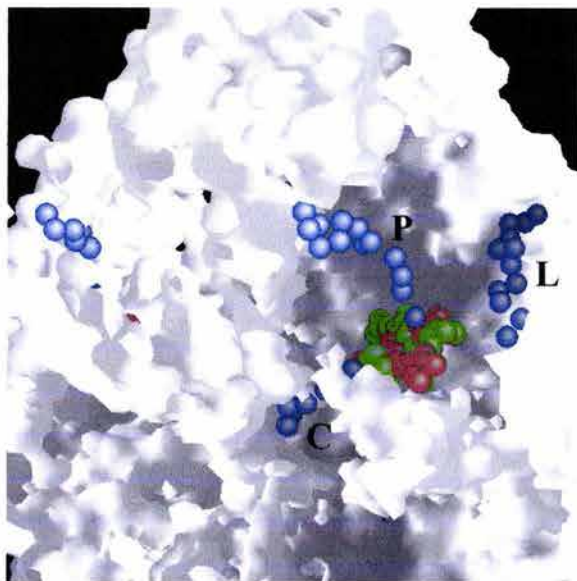


Fig. 22.- Los canales de la CAT-1. El canal principal (P), el canal lateral (L) y el canal central (C) en una imagen de la superficie de la CAT-1. Las esferas azules corresponden a las moléculas de agua, y las esferas rojas y verdes corresponden al hemo *b* y *d*, respectivamente.

En un estudio de dinámica molecular con la PMC, resultó que el canal principal es la única vía al sitio activo y que tanto el sustrato como los productos usan este canal. Sin embargo, el H_2O y el O_2 también se han detectado en la cavidad entre el hemo y la Ser196. Dicha cavidad puede tener un papel importante durante la reacción catalítica (77). Otro estudio de dinámica molecular con la SCCA indica que el canal principal es la ruta preferente de entrada y salida de los productos, pero también participan los otros canales en la liberación de los productos (78). Sin embargo, no hay evidencia experimental de que los productos de la reacción puedan salir por el canal lateral o el canal central.

DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS

a) Estabilidad

La CAT-1 es muy resistente en varias condiciones desnaturalizantes (temperatura, clorhidrato de guanidina, SDS, urea y altas concentraciones de sal). De tal manera que la CAT-1 resultó ser inclusive más resistente que otras catalasas grandes como la HP11 y las catalasas de *Aspergillus*. Se ha propuesto que la alta resistencia al calor y a los desnaturalizantes de las catalasas se puede deber al entrelazado de sus monómeros, así como a la presencia de carbohidratos en algunas de ellas. El dominio en el extremo C-terminal parece contribuir también a la estabilidad térmica en la HP11 (79).

b) La CAT-1a y la CAT-1e

La comparación de la CAT-1 no modificada con la enzima totalmente modificada por el oxígeno muestra que ambas enzimas tienen diferencias estructurales y funcionales. Las diferencias estructurales se hicieron evidentes con la menor estabilidad de la CAT-1e en altas temperaturas, el clorhidrato de guanidina y la proteólisis. Las diferencias funcionales con la baja actividad y estabilidad en pH extremos de la CAT-1e y el aumento en la sensibilidad de la CAT-1e a la inhibición con cianuro. Sin embargo las diferencias entre ambas enzimas son sutiles y en condiciones fisiológicas ambas mantienen su función. Al parecer, de acuerdo con la estructura cristalográfica, la única diferencia entre la CAT-1a y la CAT-1e es, en esta última, la presencia de un hemo oxidado (hemo *d*). Para confirmar analíticamente la oxidación del hemo se podría realizar una espectrometría de masas del hemo de la CAT-1a y de la CAT-1e, o alternativamente, tener una evidencia espectroscópica de los hemos de ambas enzimas. También, dada la posibilidad de renaturalizar la enzima luego del tratamiento con una alta temperatura o con clorhidrato de guanidina, se podría reemplazar el hemo de la CAT-1a con un hemo oxidado de la CAT-1e y demostrar que sus propiedades estructurales y funcionales son iguales a las de la CAT-1e producida por oxidación del hemo *in situ*.

c) Posible función del dominio del extremo C-terminal

Se podrían usar proteasas para conocer la función del dominio del extremo C-terminal en la CAT-1. El dominio del extremo C-terminal se podría cortar por ejemplo con

subtilisina y analizar si la enzima sin este dominio presenta diferencias cinéticas o de estabilidad respecto a la enzima nativa. También se podrían hacer pruebas de unión al dominio C-terminal con diferentes nucleótidos o ácidos nucleicos.

d) El enlace covalente Cys-Tyr y su posible relación con la resistencia al H₂O₂

La unión covalente Cys-Tyr de la CAT-1 se explica por un mecanismo de radicales libres que está relacionado con la actividad enzimática (inicia con el compuesto I) y es independiente del mecanismo de la oxidación del hemo. Se propone que la unión covalente haría menos frecuente la formación del compuesto II y por lo tanto la resistencia a la inhibición e inactivación con sustrato en las catalasas grandes tiene que ver con la unión covalente. Una forma de verificar la posible función del enlace covalente Cys-Tyr en la CAT-1 se puede hacer generando la mutante C356A. La estructura cristalográfica de dicha mutante y su caracterización cinética ayudarán para ver la función del enlace covalente y si tiene que ver con la resistencia de la enzima al sustrato.

Para comprobar si es posible que se forme un enlace covalente entre una glutamina y la tirosina esencial de una catalasa con subunidades grandes se planea determinar la estructura cristalográfica de la CAT-3 de *N. crassa*, la cual tiene la Gln366 en vez de la Cys356 de la CAT-1. Actualmente se tienen datos de difracción de rayos X de la CAT-3 a 2.05 Å de resolución². En otras catalasas grandes existe una metionina en la posición de la Cys356 de la CAT-1. Para comprobar si la metionina puede formar un enlace covalente con la tirosina esencial se generará una mutante de la CAT-1 y se le determinará su estructura cristalográfica.

e) Cinética compleja

La cinética de saturación de la CAT-1 es compleja y el mejor ajuste de los datos se obtuvo con el modelo de dos componentes que pueden tener o no cooperatividad. La cinética no-hiperbólica de la CAT-1a y de la CAT-1e se puede deber a diferentes mecanismos. Ésta puede ser el resultado de una cooperatividad negativa entre los sitios activos en una misma molécula de enzima o por heterogeneidad de sitios activos, debida a

² Victor Julián Valdés obtuvo los cristales de la CAT-3 y Enrique Rudiño-Piñera colectó los datos de difracción de rayos X.

la asimetría en una molécula de enzima o diferentes formas de la enzima. Sin embargo, no hay evidencia de la presencia de isoenzimas en la preparación de la CAT-1, y la enzima oxidada exhibe la misma cinética no-hiperbólica que la enzima no oxidada. Por lo tanto, la heterogeneidad de los sitios activos, si esta es la causa de la cinética observada, no se debe a la oxidación.

La cinética no-hiperbólica puede tener un origen cinético. La reacción catalizada por las catalasas involucra la adición ordenada de dos moléculas de sustrato, aunque ambas son H_2O_2 . El mecanismo químico es consistente con un mecanismo cinético de Ping-Pong donde el producto liberado en la primera reacción parcial es H_2O y H_2O y O_2 son liberados en la segunda. En este mecanismo cinético, si uno de los pasos de la liberación del producto está limitado, la “activación del sustrato” puede presentarse por una liberación del producto alternativa y más rápida que involucra la formación previa de un complejo abortivo ternario entre el sustrato y el complejo enzima-producto. Esto daría una cinética no-hiperbólica como la observada en la CAT-1. Este mecanismo cinético puede resultar en una inhibición por sustrato, si la liberación del producto del complejo abortivo ternario enzima-producto-sustrato es más lento que el del complejo binario enzima-producto, el cual podría estar relacionado con la inhibición por sustrato observada en las catalasas pequeñas. Sin embargo, la inhibición con sustrato en las catalasas pequeñas se explica por la formación de los compuestos II y III inactivos (26). Los resultados no permiten concluir si la cinética compleja de la CAT-1 se debe a i) la cooperatividad negativa entre los sitios activos, ii) la presencia de dos clases de sitios activos, o iii) un origen cinético, con un mecanismo que involucre una rápida liberación de los productos inducido por la alta concentración del sustrato. Cualquiera que sea la razón de esta cinética compleja, es claro que tanto la CAT-1 como otras catalasas grandes han evolucionado para desarrollar un mecanismo que les permita catalizar la reacción en altas concentraciones de sustrato con una eficiencia catalítica sólo un orden de magnitud menos que en bajas concentraciones de sustrato.

La propuesta de una puerta (Ser198) en el canal principal de la CAT-1 podría explicar la cinética compleja de la CAT-1. La cavidad pequeña antes de la puerta podría percibir la concentración del sustrato y regular la apertura de la puerta. En altas concentraciones de H_2O_2 la puerta se abriría ocasionando el aumento de la actividad en la CAT-1 y permitiendo una catálisis sin limitaciones. La estructura de la mutante inactiva de

la HPII H128N, incubada con H_2O_2 , muestra las moléculas de H_2O_2 localizadas en la cavidad pequeña antes de la Ser234 (equivalente a la Ser198 en CAT-1), lo cual apoya que la serina puede ser una puerta en las catalasas grandes. Una manera de probar que la Ser198 es la responsable de la cinética compleja sería diseñar mutantes de esta serina, por ejemplo S198A y ver si la mutante pierde o modifica su cinética. La cinética de la mutante S198A sería en bajas y altas concentraciones de sustrato (de 0.01 a 3.0 M) para compararla con la CAT-1 nativa. Si la Ser198 funciona como una puerta y es la responsable de la cinética de dos componentes en la CAT-1, entonces la mutante S198A ya no tendría una cinética de dos componentes y probablemente su cinética se ajuste al modelo de Michaelis-Menten. Otra manera de probar si la Ser198 funciona como una puerta en la CAT-1 podría ser con una dinámica molecular. En la CAT-1 nativa se podrían simular bajas concentraciones de sustrato y analizar cómo es la trayectoria del sustrato en el canal principal. La anterior simulación de la CAT-1 se compararía con una simulación con altas concentraciones de sustrato, para analizar si hay diferencias y si hay cambios en la posición de la Ser198 en altas concentraciones de sustrato.

f) Canales

En este trabajo se propone que el canal central y el lateral podrían funcionar como los canales de salida de los productos en las catalasas grandes. El canal central sería la salida del O_2 y el lateral la salida del H_2O . Para comprobar lo anterior se pueden diseñar mutaciones en la CAT-1 que obstruyan y otras que hagan más accesibles los canales. La caracterización cinética y la estructura de dichas mutantes ayudarán para ver si dichos canales participan en la salida de los productos. Asimismo, los estudios de dinámica molecular de las mutantes y la enzima nativa ayudarán para conocer la trayectoria del oxígeno y del agua.

g) Oxidación del hemo

El hemo de la CAT-1 se oxida por el oxígeno en singulete (8, 53) y es probable que la formación del hemo *d* se deba a esta especie de oxígeno reactiva. El hemo *d* se puede formar con el oxígeno en singulete a través de la dihidroxilación en el enlace C5-C6 del anillo pirrólico III del hemo. El hidroxilo del C5 puede reaccionar después con el grupo

carbonilo del propionato formando la γ -espirolactona. El oxígeno en singulete se puede formar por la catálisis de la catalasa debido a la alta eficiencia catalítica de la enzima. Otra fuente de oxígeno en singulete es la luz. Las porfirinas son excitadas por la luz azul y el O_2 puede absorber esta energía y formar oxígeno en singulete. Entonces, el O_2 en el sitio activo puede formar oxígeno en singulete por fotosensibilización.

Una manera de probar que el oxígeno en singulete es la especie que forma el hemo *d* sería generar una mutante inactiva de la CAT-1 que tenga exclusivamente hemo *b* (por ejemplo, N165H, H92A o H92N). La mutante se expondría a una fuente de oxígeno singulete y después se analizaría el hemo *b* para ver si se transformó en hemo *d*.

El sitio de oxidación en las catalasas probablemente dependa de por dónde sale el O_2 de la enzima. La oxidación del hemo en las catalasas grandes apoya la propuesta que la salida del O_2 es por el canal central. En cambio, la metionina sulfona encontrada en la PMC (37) es una modificación que probablemente se origina por el oxígeno en singulete en su salida por el canal principal. Lo mismo podría originar la ruptura del hemo en la BLC y la PMC. Esto sugiere que en las catalasas pequeñas la salida del O_2 es por el canal principal. El oxígeno en singulete en el sitio activo podría explicar la fotoinactivación en las catalasas pequeñas y las modificaciones en otras hemoproteínas. Muchas catalasas pequeñas son fotoinactivadas, en cambio la CAT-1 es muy resistente a la fotoinactivación (8). En la estructura cristalográfica de la catalasa-peroxidasa de *Burkholderia pseudomallei* se encontró un peróxido unido a un vinilo del hemo y un doble enlace entre Met-Tyr-Trp (80) que también se podrían originar con el oxígeno en singulete.

h) La función biológica de la CAT-1

La alta resistencia de la CAT-1 a la desnaturalización y a las altas concentraciones de sustrato puede estar relacionada con la germinación de los conidios. La CAT-1 se acumula en los conidios, los cuales se forman como respuesta a una tensión oxidativa (6, 56). Cuando germina el conidio debe contender con altas concentraciones de H_2O_2 producido por la NADPH oxidasa de las plantas sobre las cuales crece *N. crassa*. La alta concentración de la CAT-1 en los conidios y su alta resistencia favorecen la germinación aún en condiciones adversas.

La catalasa es una enzima antioxidante fundamental y, tal vez por eso, por lo menos en las catalasas grandes, la enzima evolucionó manteniendo su función a pesar de la oxidación del hemo. La oxidación del hemo también podría ser una señal de inicio para la degradación de la enzima.

CONCLUSIONES

Las conclusiones del primer artículo son:

La CAT-1 se une a la lectina Concanavalina-A, lo cual indica que esta enzima está glicosilada con α -glucosa y/o α -manosa.

La CAT-1 es más resistente que otras catalasas a la inactivación por calor, a una alta concentración de sal y por varios desnaturalizantes. Es activa en un intervalo de pH de 4.0 a 12.0, se inactiva con 3-amino-1,2,4-triazol, azida e hidroxilamina y se inhibe competitivamente con cianuro. Lo anterior indica que la CAT-1 es una catalasa monofuncional.

Las conclusiones del segundo artículo son:

La CAT-1 presentó una cinética compleja en altas concentraciones de sustrato, ya que la V_{\max} y la K_m son mayores que en concentraciones bajas. La cinética de la CAT-1 se ajustó a un modelo de dos componentes, uno a bajas concentraciones de sustrato (<100 mM) y el segundo a altas concentraciones de H_2O_2 (>250 mM). Estos componentes pueden presentar cooperatividad, el primero con una $n = 1.2$ y el segundo con una $n = 1.7$. La CAT-1e presentó valores mayores en sus $S_{0.5}$ respecto a la CAT-1a. Sin embargo, los valores de las V_{\max} , las k_{cat} y las eficiencias catalíticas fueron similares para la CAT-1a y la CAT-1e, lo cual indica que la CAT-1e modificada por el oxígeno mantiene su función aún en concentraciones molares de sustrato.

La CAT-1e es más sensible a la inhibición con cianuro que la CAT-1a. Lo anterior probablemente esté relacionado con un cambio en el sitio activo en la CAT-1e. En cambio, los inactivadores 3-amino-1,2,4-triazol, la azida y la hidroxilamina no mostraron diferencias significativas entre la CAT-1a y la CAT-1e.

La CAT-1e es menos activa en los pH extremos (ácido y básico) y menos estable en pH ácido (4.0 a 6.0) que la CAT-1a, lo anterior apoya la existencia de un cambio estructural en la CAT-1 cuando se modifica por el oxígeno.

Las energías de activación para la catálisis de la CAT-1e respecto a la CAT-1a no tuvieron diferencias significativas, lo cual indica que ambas enzimas presentan una catálisis similar.

La CAT-1a fue más estable que la CAT-1e a la inactivación por temperatura, a concentraciones molares de clorhidrato de guanidina y a la degradación proteolítica con subtilisina, lo cual indica que los cambios producidos por la oxidación hacen a la enzima menos estable en condiciones extremas. En cambio, los espectros de dicroísmo circular y de emisión de fluorescencia de la proteína, así como, los espectros de emisión de fluorescencia del hemo, no detectaron diferencias significativas entre la CAT-1a y la CAT-1e.

Existen diferencias cinéticas y estructurales entre la CAT-1a y la CAT-1e. Sin embargo, dichas diferencias sólo fueron evidentes en condiciones extremas; en condiciones fisiológicas ambas enzimas deben ser funcionalmente equivalentes.

Las conclusiones del tercer artículo son:

La secuencia del extremo N-terminal de la CAT-1 indica que la enzima se procesa, ya que no contiene los primeros 21 aminoácidos y en el cristal no se observan los siguientes 17, por lo cual el modelo de la CAT-1 inicia en el aminoácido número 39.

La CAT-1 presenta cuatro canales que conducen al sitio activo: el canal principal, el canal lateral, el canal central y un canal menor. Los tres primeros están definidos claramente por moléculas de agua que forman puentes de hidrógeno entre ellas. Probablemente el canal lateral es la salida del H₂O que se produce por la catálisis y el canal central podría ser la salida del O₂.

El hemo de la CAT-1 resultó ser una mezcla del hemo *b* con un hemo oxidado, que tiene un hidroxilo y una γ -espirolactona en conformación *cis* en el anillo pirrólico III, denominado hemo *d*. La proporción de hemo *b* es de 57% y de hemo *d* de 43%. El oxígeno en singulete podría ser la especie que oxida al hemo.

La CAT-1 presenta un enlace covalente inusual Cys-Tyr. El enlace se forma entre el azufre de la Cys356 y el C β de la Tyr379 que coordina el Fe del hemo. Dicho enlace covalente probablemente esté relacionado con la resistencia de la enzima a la inactivación con el sustrato.

REFERENCIAS

1. Navarro RE, Stringer MA, Hansberg W, Timberlake WE y Aguirre J (1996) *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr Genet* 29:352–359.
2. Hengge-Aronis R (1993) Survival of hunger and stress—the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *Escherichia coli*. *Cell* 72:165–168.
3. Loewen PC y Switala, J (1998) Purification and characterization of spore-specific catalase-2 from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 169:3601–3607.
4. Bagyan I, Casillas-Martínez L y Setlow P (1998) The *katX* gene, which codes for the catalase in spores of *Bacillus subtilis*, is a forespore-specific gene controlled by σ^F , and *KatX* is essential for hydrogen peroxide resistance of the germinating spore. *J Bacteriol* 180:2057–2062.
5. Willekens H, Langebartels C, Tiré C, van Montagu M, Inzé D y van Camp W (1994) Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10450–10454.
6. Hansberg W (1996) A hyperoxidant state at the start of each developmental stage during *Neurospora crassa* conidiation. *Cienc Cult* 48:68-74.
7. Michán S, Lledías F, Baldwin JD, Natvig DO y Hansberg W (2002) Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. *Free Radic Biol Med* 33:521-532.
8. Lledías F, Rangel P y Hansberg W (1998) Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem* 273:10630-10637.
9. Hansberg W (1999) La biología del oxígeno en singlete. *TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, FES Zaragoza UNAM 2:47-55.
10. Maté MJ, Zamocky M, Nyquirí LM, Herzog C, Alzari PM, Betzel C, Koller F y Fita I (1999) Structure of catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 286:135-149.
11. Hansberg W y Aguirre J (1990) Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J Theor Biol* 142:201-221.
12. Hansberg W (2002) Biología de las especies de oxígeno reactivas. En: *Mensaje Bioquímico XXVI*. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. p 19-54.
13. Halliwell B y Gutteridge JMC (1999) *Free radicals in biology and medicine*. Tercera edición. Oxford University Press, Oxford. p 103-140.
14. Switala J y Loewen PC (2002) Diversity of properties among catalases. *Arch Biochem Biophys* 401:145-154.

15. Murshudov GN, Grebenko AI, Brannigan JA, Antson AA, Barynin VV, Dodson GG, Dauter Z, Wilson KS y Melik-Adamyanyan WR (2002) The structures of *Micrococcus lysodeikticus* catalase, its ferryl intermediate (compound II) and NADPH complex. *Acta Crystallogr D* 58:1972-1982.
16. Gaetani GF, Galiano S, Canepa L, Ferris AM y Kirkman HN (1989) Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood* 73:334-339.
17. Halliwell B y Gutteridge JMC (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals, and disease. *J Biochem* 219:1-14.
18. Vuillame M (1987) Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation. *Mutat Res* 186, 43-72.
19. Mallery SR, Bailer RT, Hohl CM, Ng-Bautista CL, Ness GM, Livingston BE, Hout BL Stephens RE y Brierley GP (1995) Cultured AIDS-related Kaposi's sarcoma (AIDS-KS) cells demonstrate impaired bioenergetic adaptation to oxidant challenge: implication for oxidant stress in AIDS-KS pathogenesis. *J Cell Biochem* 59: 317-28.
20. Loewen PC (1997) Bacterial catalases. En: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Editor: Scandalios, J. G. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 273–308.
21. Ruis H y Koller F (1997) Biochemistry, molecular biology, and cell biology of yeast and fungal catalases. En: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Editor: Scandalios, J. G. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 309–342.
22. Chary P y Natvig DO (1989) Evidence of three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock, and development. *J Bacteriol* 171:2646-2652.
23. Kawasaki L, Wysong D, Diamond R y Aguirre J (1997) Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J Bacteriol* 179:3284–3292.
24. Scandalios JG, Guan L y Polidoros AN (1997) Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. En: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Editor: Scandalios, J. G. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 343–345.
25. Rovira C y Fita I (2003) The proximal hydrogen-bonded residue controls the stability of the compound II intermediate of peroxidases and catalases. *J Phys Chem B* 107:5300-5305.

26. Lardinois OM, Mestdagh MM y Rouxhet PG (1996) Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1295:222-238.
27. Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y y Tainer JA (2000) Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol* 296:295-309.
28. Carson M (1997) "Ribbons". *Methods Enzymol* 277:493-505.
29. Klotz MG y Loewen PC (2003) The molecular evolution of catalatic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from bacteria into eukaryota. *Mol Biol Evol* 20:1098-1112.
30. Carpena X, Soriano M, Klotz MG, Duckworth HW, Donald LJ, Melik-Adamyan W, Fita I y Loewen PC (2003) Structure of the Clade I catalase, CatF of *Pseudomonas syringae*, at 1.8 Å resolution. *Proteins* 50:423-436.
31. Johnson CH, Klotz MG, York JL, Kruff V y McEwen JE (2002) Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases. *Microbiology* 148:1129-1142.
32. Maté MJ, Servinc MS, Hu B, Bujons J, Bravo J, Switala J, Ens W, Loewen PC y Fita I (1999) Mutants that alter the covalent structure of catalase hydroperoxidase II from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 274:27717-27725.
33. Melik-Adamyan W, Bravo J, Carpena X, Switala J, Maté MJ, Fita I y Loewen PC (2001) Substrate flow in catalases deduced from the crystal structures of active site variants of HPII from *Escherichia coli*. *Proteins* 44:270-281.
34. Chauvatcharin N, Vattanaviboon P, Switala J, Loewen PC y Mongkolsuk S (2003) Cloning and characterization of *kata*, encoding the major monofunctional catalase from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and characterization of the encoded catalase KatA. *Curr Microbiol* 46:83-87.
35. Switala J, O'Neil JO y Loewen PC (1999) Catalase HPII from *Escherichia coli* exhibits enhanced resistance to denaturation. *Biochemistry* 38:3895-3901.
36. Murshudov GN, Melik-Adamyan WR, Grebenko AI, Barynin VV, Vagin AA, Vainshtein BK, Dauter Z y Wilson KS (1992) Three-dimensional structure of catalase from *Micrococcus lysodeikticus* at 1.5 Å resolution. *FEBS Lett* 312:127-131.
37. Gouet P, Jouve HM y Dideberg O (1995) Crystal structure of *Proteus mirabilis* PR catalase with and without bound NADPH. *J Mol Biol* 249:933-954.
38. Bravo J, Verdaguer N, Tormo J, Betzel C, Switala J, Loewen PC y Fita I (1995) Crystal structure of catalase HPII from *Escherichia coli*. *Structure* 3:491-502.

39. Bravo J, Maté MJ, Schneider T, Switala J, Wilson K, Loewen PC y Fita I (1999) Structure of catalase HPII from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution. *Proteins* 34:155-166.
40. Murthy MR, Reid TJ, Sicignano A, Tanaka N y Rossmann MG (1981) Structure of beef liver catalase. *J Mol Biol* 152:465-499.
41. Fita I, Silva AM, Murthy MR y Rossmann MG (1986) The refined structure of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr B* 42:497-515.
42. Vainshtein BK, Melik-Adamyán WR, Barynin VV, Vagin AA, Grebenko AI, Borisov VV, Bartels KS, Fita I y Rossmann MG (1986) Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* 188:49-61.
43. Bravo J, Fita I, Gouet P, Jouve HM, Melik-Adamyán W y Murshudov GN (1997) Structure of catalases. En: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Editor: Scandalios J G. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. pp 407-445.
44. Bravo J, Fita I, Ferrer JC, Ens W, Hillar A, Switala J y Loewen PC (1997) Identification of a novel bond between a histidine and the essential tyrosine in catalase HPII of *Escherichia coli*. *Protein Sci* 6:1016-1023.
45. Murshudov GN, Grebenko AI, Barynin V, Dauter Z, Wilson KS, Vainshtein VK, Melik-Adamyán W, Bravo J, Ferran JM, Ferrer JC, Switala J, Loewen PC y Fita I (1996) Structure of the heme *d* of *Penicillium vitale* and *Escherichia coli* catalases. *J Biol Chem* 271:8863-8868.
46. Toledo I, Aguirre J y Hansberg W (1986) Aerial growth in *Neurospora crassa*: characterization of an experimental model-system. *Exp Mycol* 10:114-125.
47. Springer ML y Yanofsky C (1989) A morphological and genetic analysis of conidiophore development in *Neurospora crassa*. *Genes Dev* 3:559-571.
48. Hansberg W, de Groot H y Sies H (1993) Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radic Biol Med* 14:287-293.
49. Toledo I y Hansberg W (1990) Protein oxidation related to morphogenesis in *Neurospora crassa*. *Exp Mycol* 14:184-189.
50. Toledo I, Noronha-Dutra AA y Hansberg W (1991) Loss of NAD(P)-reducing power and glutathione disulfide excretion at the start of induction of aerial growth in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* 173:3243-3249.
51. Toledo I, Aguirre J y Hansberg W (1994) Enzyme inactivation related to a hyperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*. *Microbiol* 140:2391-2397.

52. Toledo I, Rangel P y Hansberg, W (1995) Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation. Arch Biochem Biophys 319:519-524.
53. Lledías F, Rangel P y Hansberg W (1999) Singlet oxygen is part of a hyperoxidant state generated during spore germination. Free Radic Biol Med 26:1396-1404.
54. Michán S, Lledías F, Baldwin JD, Natvig DO y Hansberg W (2002) Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. Free Radic Biol Med 33:521-532.
55. Peraza L y Hansberg W (2002) *Neurospora crassa* catalases, singlet oxygen and cell differentiation. Biol Chem 383:569-575.
56. Michán S, Lledías F y Hansberg W (2003) Asexual development is increased in *Neurospora crassa* cat-3-null mutant strains. Eukaryot Cell 2:798-808.
57. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G y Gray T (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. Protein Sci 4:2411-2423.
58. Rørth M y Jensen PK (1967) Determination of catalase activity by means of the Clark oxygen electrode. Biochim Biophys Acta 139:171-173.
59. Reyes-Vivas H, Martínez-Martínez E, Mendoza-Hernández G, López-Velázquez G, Pérez-Monfort R, Tuena de Gómez-Puyou M. y Gómez-Puyou A (2002) Susceptibility to proteolysis of triosephosphate isomerase from two pathogenic parasites: characterization of an enzyme with an intact and a nicked monomer. Proteins 48:580-590.
60. Otwinowski Z (1993) *Data Collection and Processing* (Sawyer L, Isaacs N y Bailey S eds), pp 56-62, Science and Engineering Research Council, Warrington, UK.
61. Collaborative Computational Project, No. 4 (1994) The CCP4 Suite: programs for protein crystallography. Acta Crystallog sect D 50:760-767.
62. Brünger AT, Adams PD, Clore GM, *et al* (1998) Crystallography and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. Acta Crystallog sect D 54:905-921.
63. Jones TA, Zou JY, Cowan SW y Kjeldgaard M (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in those models. Acta Crystallog sect A 47:110-119.
64. van den Akker F y Hol WGJ (1999) Difference density quality (DDQ): a method to assess the global and local correctness of macromolecular crystal structures. Acta Crystallog sect D 55:206-218.
65. Kukuchi-Torii K, Hayashi S, Nakamoto H, y Nakamura S (1992) Properties of *Aspergillus niger* catalase. J Biochem (Tokyo) 92:1449-1456.

66. Calera JA, Sánchez-Weatherby J, López-Medrano R y Leal F (2000) Distinctive properties of the catalase B of *Aspergillus nidulans*. FEBS lett 475:117-120.
67. Takasuka T, Sayers NM, Anderson MJ, Benbow EW y Denning DW (1999) *Aspergillus fumigatus* catalases: cloning of an *Aspergillus nidulans* catalase B homologue and evidence for at least three catalases. FEMS Immunol Med Microbiol 23:125-133.
68. Zancope-Oliveira RM, Reiss E, Lott TJ, Mayer LW y Deepe GS Jr. (1999) Molecular cloning, characterization, and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*. Infect Immun 67:1947-1953.
69. Loewen PC y Switala J (1986) Purification and characterization of catalase HPII from *Escherichia coli* K12. Biochem Cell Biol 64:638-646.
70. Sevinc MS, Maté MJ, Switala J, Fita I y Loewen PC (1999) Role of the lateral channel in catalase HPII of *Escherichia coli*. Protein Sci 8:490-498.
71. Maj M, Nicholls P, Obinger C, Hillar A y Loewen PC (1996) Reaction of *E. coli* catalase HPII with cyanide as ligand and inhibitor. Biochim Biophys Acta 1298: 241-249.
72. Hirasawa M, Gray KA, Shaw RW y Knaff DB (1987) Spectroscopic properties of spinach catalase. Biochim Biophys Acta 911:37-44.
73. Hirasawa M, Gray KA, Ondrias MR, Larsen RW, Shaw RW, Morrow KJ Jr. y Knaff DB (1989) Prosthetic group content and ligand binding properties of a spinach catalase. Biochim Biophys Acta 994:229-234.
74. Jacob GS y Orme-Johnson WH (1979) Catalase of *Neurospora crassa*. 2. Electron paramagnetic resonance and chemical properties of the prosthetic group. Biochemistry 18:2975-2980.
75. Kikuchi K, Kawamura-Konishi Y y Suzuki H (1992) The reaction of *Aspergillus niger* catalase with methyl hydroperoxide. Arch Biochem Biophys 296:88-94.
76. Chelikani P, Carpena X, Fita I y Loewen, PC (2003) An electrical potential in the access channel of catalases enhances catalysis. J Biol Chem 278:31290-31296.
77. Amara P, Andreoletti P, Jouve HM y Field MJ (2001) Ligand diffusion in the catalase from *Proteus mirabilis*: a molecular dynamics study. Protein Sci 10:1927-1935.
78. Kalko SG, Gelpi JL, Fita I y Orozco M (2001) Theoretical study of the mechanisms of substrate recognition by catalase. J Am Chem Soc 123:9665-9672.
79. Chelikani P, Donald LJ, Duckworth HW, y Loewen, PC (2003) Hydroperoxidase II of *Escherichia coli* exhibits enhanced resistance to proteolytic cleavage compared to other catalases. Biochemistry 42: 5729-5735.

80. Carpena X, Loprasert S, Mongkolsuk S, Switala J, Loewen PC y Fita I (2003) Catalase-peroxidase KatG of *Burkholderia pseudomallei* at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol* 327:475-489.

MOLECULAR AND KINETIC STUDY OF CATALASE-1, A DURABLE LARGE CATALASE OF *NEUROSPORA CRASSA*

ADELAIDA DÍAZ, PABLO RANGEL, YÉSIKA MONTES DE OCA, FERNANDO LLEDÍAS, and WILHELM HANSBERG
Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

(Received 21 March 2001; Accepted 15 June 2001)

Abstract—Catalase-1 (Cat-1), one of the two monofunctional catalases of *Neurospora crassa*, increases during asexual spore formation to constitute 0.6% of total protein in conidia. Cat-1 was purified 170-fold with a yield of 48% from conidiating cultures. Like most monofunctional catalases, Cat-1 is a homotetramer, resistant to inactivation by solvents, fully active over a pH range of 4–12, and inactivated by 3-amino-1,2,4-triazole. Unlike most monofunctional catalases, Cat-1 consists of 88 kDa monomers that are glycosylated with α -glucose and/or α -mannose, is unusually stable, and is not inactivated or inhibited by hydrogen peroxide. Cat-1 was more resistant than other catalases to heat inactivation and to high concentrations of salt and denaturants. Cat-1 exhibited unusual kinetics: at molar concentrations of hydrogen peroxide the apparent V was 10 times higher than at millimolar concentrations. Inactivation of Cat-1 activity with azide and hydroxylamine was according to first order kinetics, while cyanide at micromolar concentrations was a reversible competitive inhibitor. © 2001 Elsevier Science Inc.

Keywords—Large catalase, Cell differentiation, Asexual spores, *Neurospora*, Enzyme stability, Free radicals

INTRODUCTION

Although catalases have been studied for decades, there are many interesting questions still unsolved regarding catalase function and structure. Mammalian and other catalases have a binding site for NADPH, whose function is not understood entirely [1]. Large catalases like the HPII enzyme from *Escherichia coli*, present only in bacteria and fungi [2], do not bind NADPH but have an extra “flavodoxin-like” domain of unknown function [3]. Mammalian catalases are inhibited by substrate; other catalases are not affected by molar concentrations of hydrogen peroxide [4–6]. Many bacteria, fungi, and plants have several catalases that are differently regulated [7–12]. Most interestingly, catalases are related to development in various organisms [10,13–16].

We study the cell-differentiation processes of *Neurospora crassa*. A synchronous process of asexual spore (conidia) formation is started when an aerated liquid culture is filtered and the resulting mycelial mat is ex-

posed to air [17,18]. Filaments (hyphae) in direct contact with air adhere to each other within 40 min, adhered mycelium start growing aerial hyphae after 2 h exposure to air, and finally conidia are formed at the tips of the branched aerial hyphae 9 h after exposure to air [17]. The formation of conidia from growing hyphae involves three morphogenetic transitions: (i) growing hyphae to adhered mycelium, (ii) adhered mycelium to aerial hyphae, and (iii) aerial hyphae to conidia. A hyperoxidant state develops at the start of each of these morphogenetic transitions [19–23]. Oxidative stress also develops at the start of germination of conidia [24]. Based on these results, cell differentiation is considered to be a response to a hyperoxidant state in which cells become insulated from environmental dioxygen [25,26].

Adaptation of cellular antioxidant mechanisms during cell differentiation is an expected consequence. In studies of the activity of antioxidant enzymes during the asexual life cycle of *N. crassa*, large differences in the specific activity of catalase were observed. There was a step-wise increase of catalase activity during the formation of conidia. In fact, conidia have 60 times more catalase activity than hyphae growing in a liquid medium [26]. In addition to changes in activity, three different catalases were detected in the *N. crassa* asexual life cycle

Address correspondence to: Wilhelm Hansberg, M.D., Ph.D., Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70-242; 04510 México, D. F., México; Tel: +52 (5) 622-5655; Fax: +52 (5) 622-5630; E-Mail: whansber@ifisiol.unam.mx.

[9]. The monofunctional catalase-3 activity increases at the end of exponential growth and during adhesion of hyphae; the catalase-peroxidase activity, catalase-2, rises transiently in the aerial hyphae; and the monofunctional Cat-1 augments many times during formation of conidia. The main catalase activity in conidia is due to Cat-1 [24,26]. This catalase has a chlorin instead of the ferroprothemo IX of other catalases and is oxidized by singlet oxygen during conidiation and germination of conidia [24,26,27].

Cat-1 is found in conidia at a very high concentration. Thus, Cat-1 could have characteristics that are especially suitable for the spore and its survival. In fact, Cat-1 exhibited an unusual resistance to inactivation by temperature and various denaturants. It was a highly glycosylated enzyme. Cat-1 was not inhibited by molar concentrations of hydrogen peroxide and had a different kinetic behavior at low and high substrate concentrations.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Chemicals were from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA) unless otherwise stated.

Strains and culture conditions

Neurospora crassa wild type strain, 74-OR23-1A from the Fungal Genetic Stock Center, was grown from stocks of conidia kept in distilled water at -70°C . Conidia were inoculated on agar minimal-medium of Vogel [28], supplemented with 1.5% sucrose. Cultures were grown for 3 d in the dark at 30°C followed by 2 d in the light at 25°C .

Purification of Cat-1

Conidiated aerial mycelium was harvested directly in acetone. Two grams of dried acetone powders in 40 ml cold buffer H (20 mM mannitol, 1 mM 5-amino-salicylic acid, 1 mM EDTA, 0.5 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride, 0.2 mM dithiothreitol and 2% lithium dodecyl sulfate, 10 mM KCl, 10 mM borate, pH 8,) with half the volume of glass beads (710–1180 μm) were broken in a blender at full speed, three times for 20 s each, with 2 min intervals on ice. Cell extract was centrifuged 10 min at $7,700 \times g$ and 4°C , supernatant was separated and kept in the cold while the pellet in 20 ml buffer I (Buffer H without 5-amino-salicylic acid and lithium dodecyl sulfate) was homogenized again in the blender as before. The same operation was repeated once more with 10 ml buffer I. The joint soluble extracts were centrifuged, the

supernatant was frozen and thawed twice, and the resulting supernatant was precipitated with two volumes of cold acetone and kept overnight at -20°C . After centrifuging, the precipitate was dried and then resuspended in 10 ml of buffer J (20 mM mannitol, 10 mM KCl, 10 mM borate, pH 8). The pellet was resuspended twice in 10 ml buffer J and the joint soluble extracts were fractionated with ammonium sulfate at room temperature by slowly adding the salt while stirring. After stirring for 1 h, the 35% (w/v) ammonium sulfate precipitate was separated by centrifugation as before, but at room temperature. The precipitate was resuspended in 3 ml of 0.5 M ammonium sulfate in 50 mM phosphate buffer (PB), pH 7.8, and then 5 ml of Phenyl Sepharose CL-4B, equilibrated in the same buffer, was added. The resulting sludge was stirred for 30 min at room temperature, washed with 30 ml of the same solution, and then loaded on a small column. The column was washed with 20 ml of 50 mM PB and the enzyme eluted with 20 ml 10 mM PB. Fractions having most of the activity were pooled and concentrated to about 1 ml by centrifugation at $5,000 \times g$ in Ultrafree-CL cellulose filters 5000 NMWL (Millipore, Bedford, MA, USA). A second passage through the Phenyl Sepharose column was carried out to increase the purity of the catalase.

Analytical methods

Protein in fractions of purified Cat-1 was determined by the Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Cross-linking with glutaraldehyde. Purified Cat-1 (25 μg) was treated with 5, 10, 15, or 20 mM of glutaraldehyde (Merck, Darmstadt, Germany) in 150 mM PB, pH 7.0, for 2 min at 15°C . The reaction was stopped by adding to each sample 10 μl of a mixture containing 5% (v/v) β -mercaptoethanol and 4% (w/v) SDS. Samples were boiled for 10 min in a water bath and analyzed by PAGE in a 4.5% polyacrylamide gel. After electrophoresis the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad).

Determination of protein glycosylation. Purified Cat-1 (5, 10, or 15 μg per lane) was separated by PAGE. The gel was cut in two halves; one half was stained with the Schiff's reagent and the other was stained for catalase activity. To determine glycosylation of Cat-1, protein in the gel was fixed with 10% (w/v) trichloroacetic acid for 1 h, washed with water, and treated with 1% periodic acid (w/v) in 5% acetic acid (v/v) for 2 h. After washing the gel with water, it was incubated overnight with the Schiff's reagent [29]. The gel was then washed with 6%

(w/v) sodium metabisulfite with a few drops of concentrated HCl.

Binding of different lectins was assayed to determine the kind of hexoses bound to Cat-1. Purified Cat-1 was separated by PAGE and then protein was transferred to a nitro-cellulose filter. Unspecific binding was avoided by treating the filter with 0.3% Tween 20 in PB-saline (PBS), 2 h at RT. After washing the filter with 0.3% Tween 20 in PBS, three times, 5 min each and once with PBS alone, the filter was cut into thin slices. To each slide in PBS 1 mg/ml of each lectin was added at a dilution between 1:100 to 1:2800, incubated 1 h at 4°C, and then washed with PBS. For each lectin, a positive control of the specific carbohydrates (0.5 μ l of a 10 mg/ml solution) was included. Bound Concanavalin A was detected with an α -IgG rabbit coupled with horseradish peroxidase. We have found that α -IgG rabbit binds to Concanavalin-A specifically (Fig. 3B). *Bandeiraea simplicifolia* I-biotin was incubated 1 h with avidin-horseradish peroxidase diluted 1:500 (Bio-Rad). The horseradish peroxidase activity from *Bandeiraea simplicifolia* II and *Vicia villosa* was revealed by incubation with 0.05% 4-chloronaphtol and 0.02% hydrogen peroxide in PBS until color appeared, and then washed with water.

Enzyme assays. Catalase (EC 1.11.1.6 hydrogen peroxide:hydrogen peroxide oxido-reductase) dismutates hydrogen peroxide (H_2O_2) to produce dioxygen (O_2) and water. Catalase activity was measured by determining the initial rate of dioxygen production with a Clark electrode [30]. The reaction was started by injecting the catalase (usually 0.2 μ g in 5 μ l) into a sealed chamber filled with 2 ml of a known concentration of H_2O_2 in 50 mM PB, pH 7.8 (adjusted by mixing Na_2HPO_4 and KH_2PO_4 solutions). The H_2O_2 concentration was determined spectroscopically at 240 nm considering an extinction coefficient of 35.76 $M^{-1} cm^{-1}$. Units are defined as μ moles of H_2O_2 consumed per min at 22°C. The results of the enzymatic reactions were analyzed with the program Microcal Origin 4.10 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

A mixture of 50 mM of each the following buffers Mes, Hepes, CHES (2-[Cyclohexylamino]ethanesulfonic acid), and Caps was adjusted to the desired pH with 0.5 M HCl or NaOH. Catalase activity was assayed with 10 mM H_2O_2 .

Inactivation of Cat-1 by 3-amino-1,2,4-triazole was studied by incubating 20 μ g of the enzyme at 37°C in 1 ml of 50 mM PB pH 7.8, containing 20 mM 3-amino-1,2,4-triazole, 4 mM ascorbate and 4 mM H_2O_2 [31]. Samples (50 μ l) were withdrawn every 5 min from the incubation mixture and the remaining activity was assayed as stated above. Cat-1 (1 μ g in 2 ml PB, pH 7.8)

was incubated at 37°C for 1 min in the presence of a different concentration of azide or hydroxylamine and the remaining activity was measured by adding 10 mM H_2O_2 to the mixture. Inhibition of Cat-1 (0.2 μ g in 5 μ l) by KCN (Merck, Mexico) was measured at different concentrations of inhibitor (0.4–1.0 μ M) and different concentrations of H_2O_2 (8–60 mM).

Cat-1 stability. For all conditions assayed, Cat-1 was in 50 mM PB, pH 7.8, and activity was determined at 22°C in 2 ml of the same buffer containing 10 mM H_2O_2 . Cat-1 (1 μ g in 10 μ l) was incubated for 15 min at different temperatures and remaining activity was assayed. Cat-1 (0.1 mg/ml) was incubated in a boiling water bath, 93°C at Mexico City altitude (2,240 m above sea level), for different times and activity was assayed immediately after.

The enzyme (1 μ g in 10 μ l) was incubated with different concentrations of KCl for 24 h at room temperature and its activity was assayed. Cat-1 (1.5 μ g in 500 μ l) was incubated for 30 min in different concentrations of SDS (Bio-Rad) and then enzyme activity was determined at the same SDS concentration. Cat-1 (3 μ g in 300 μ l PB) was incubated with different concentrations of urea or guanidine-HCl (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) for 48 h at room temperature to reach equilibrium. Activity was assayed by diluting one third of the incubation mixture directly in 2 ml of 10 mM H_2O_2 in PB, pH 7.8. The rest of the incubation mixture was dialyzed by centrifuging the sample in a Centricon filter YM-30 (Amicon, Bedford, MA, USA) at 5,000 \times g washing three times with 2 ml of PB pH 7.8. Protein was determined in the recovered enzyme and activity was assayed as stated previously.

RESULTS

Purification of Cat-1

Because Cat-1 is at a high concentration in conidia, we purified the enzyme from conidiated aerial mycelium grown on agar-medium. Purification made use of catalase stability in organic solvents and denaturing agents and also took advantage of catalase hydrophobicity. A cell extract from conidiated aerial hyphae was precipitated with acetone and then the Cat-1 was dissolved from the pellet with a 6-fold increase in specific activity and a yield of 74% (Table 1). After precipitation with $(NH_4)_2SO_4$ (35% w/v) a chromatography in Phenyl Sepharose yielded a fraction that had a specific activity 170 ± 3.2 times higher than that of the starting material; the yield was $48 \pm 4.6\%$ of the total cell extract activity (Table 1). From 2 g of acetone powder, 1.5 mg of purified Cat-1 was obtained. In SDS-PAGE, the

Table 1. Cat-1 Purification from Conidiated Cultures

| Fraction | Total activity (U) | Total protein (mg) | Specific activity (U/mg) | Purification (times) | Yield (%) |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|----------------------|-----------|
| Total extract | 4,345,388 | 526 | 8261 | 1.0 | 100 |
| Soluble | 3,953,066 | 379 | 10,430 | 1.3 | 91 |
| Freeze/thaw (2 times) | 3,631,766 | 231 | 15,721 | 1.9 | 84 |
| Acetone precipitation | 3,232,833 | 68 | 47,541 | 5.8 | 74 |
| 35% Ammonium sulfate precipitation | 2,402,440 | 8.2 | 292,980 | 35.5 | 55 |
| Phenyl Sepharose column | 2,107,337 | 1.5 | 1,404,891 | 170.0 | 48 |

Mean values of three purifications.

preparation showed a principal band of 88 kDa and few minor bands (Fig. 1). Minor bands diminished after a second passage through the Phenyl Sepharose column without causing a significant increase in specific activity.

Molecular analysis of Cat-1

When the purified Cat-1 was treated with different concentrations of glutaraldehyde and analyzed by SDS-PAGE, the monomer disappeared and dimers and tetramers were found in increasing amount (Fig. 2). From a lineal regres-

sion plot a mean value of 88 kDa for the monomer, 177 kDa for the dimer, and 354 kDa for the tetramer was obtained. This result indicates that native Cat-1, like most monofunctional catalases, is a homotetramer.

Using antibodies directed against Cat-1, we observed that the enzyme was associated principally with the cell wall of conidia (not shown). Its high molecular mass and association with cell wall suggested a possible glycosylation of the enzyme. Indeed, Cat-1 stained heavily with the Schiff's reagent, indicating that hexoses were bound to the protein (Fig. 3A). It bound Concanavalin-A (Fig. 3B) but not *Bandeiraea simplicifolia* lectins (BSI, BSII) or *V. villosa* lectin. Thus, hexoses are probably α -glucose

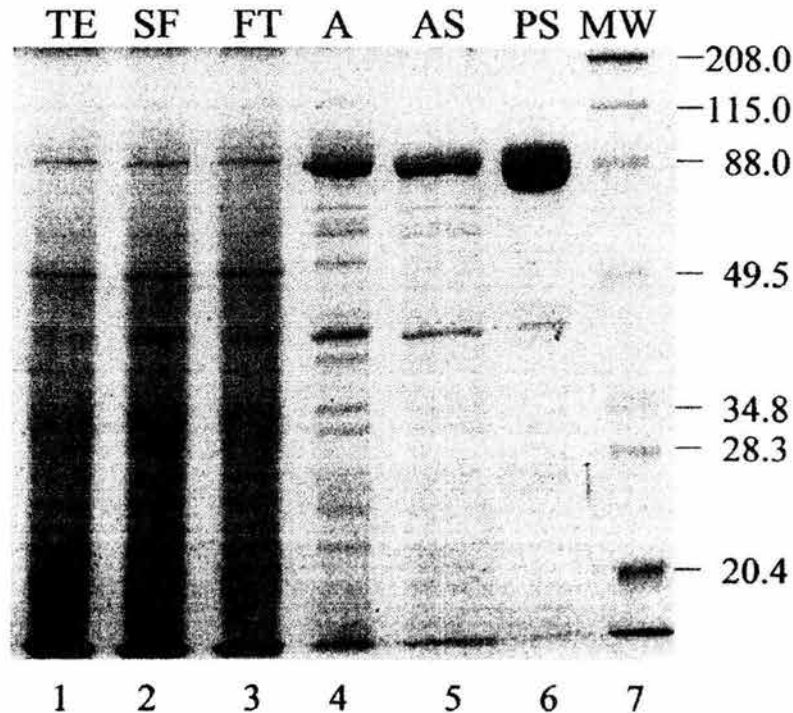


Fig. 1. Cat-1 purification from conidiated cultures. Main fractions (10 μ g) of the purification procedure were analyzed by SDS-PAGE and the gel was stained with Coomassie brilliant blue. Lanes 1 to 6 are, respectively: total extract (TE), soluble fraction (SF), extract after two cycles of freezing and thawing (FT), following acetone precipitation (A), after ammonium sulfate precipitation (AS), and subsequent elution from a Phenyl Sepharose column (PS). Lane 7 contains molecular weight standards (MW).

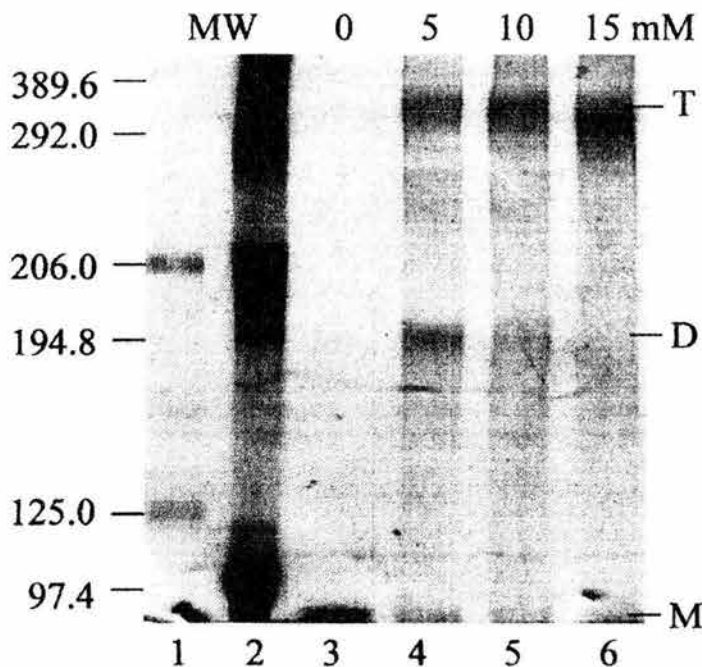


Fig. 2. Cross-linking of Cat-1 monomers with glutaraldehyde. Purified Cat-1 (5 μg) was treated with different concentrations of glutaraldehyde and then separated by PAGE in a 4.5% polyacrilamide gel, under denaturing conditions. The gel was stained with Coomassie brilliant blue. Lanes 1 and 2 are molecular weight standards; lane 3 is without glutaraldehyde, Cat-1 monomer (M) is seen at the bottom of the lane; lanes 4, 5, and 6 contain Cat-1 treated with increasing concentration of the cross-linking agent. The monomer is no longer observed in these lanes but instead a dimer (D), mainly in lane 4, and a tetramer (T) is observed, predominantly in lanes 5 and 6.

and/or α -mannose, but not α -galactose, α -galactosamine, N-acetyl-glucosamine, or N-acetyl-galactosamine.

Cat-1 stability

Because the large catalases of *Aspergilli* [32–34] and the HPII of *E. coli* [35] exhibited a high resistance to denaturation, the thermal stability of Cat-1 was determined. Cat-1 incubated at 85°C for 15 min did not lose activity. At 93°C, loss of Cat-1 was slow, 50% in 70 min (Fig. 4A).

Cat-1 was not denatured by acetone, hexane, chloroform, and ethanol, but it was inactivated by isopropanol. It was resistant to 2% dodecyl sulfate (used in the purification procedure) and remained active in the presence of 0.4 M (11.5%) SDS (Fig. 4B). A 20% increase in activity was detected at concentrations lower than 0.2 M SDS. Molar concentrations of KCl did not affect Cat-1 activity (Fig. 4B). Treatment of Cat-1 with 9 M urea for 48 h decreased its activity by 27% but full activity was recovered upon dialysis (Fig. 4C). Guanidine-HCl at 3.5 M for 48 h decreased Cat-1 activity by 50%, but activity was fully restored by dialysis; activity was lost after 48 h in 4.5 M guanidine-HCl (Fig. 4C). After dialysis the activity of some samples increased. Thus, Cat-1 was very resistant to

inactivation by temperature and by molar concentrations of salt and denaturants.

Catalytic properties of Cat-1

Cat-1 activity with increasing H_2O_2 concentration followed Michaelis-Menten kinetics with an apparent K_m of 21.7 ± 0.5 mM (Fig. 5A). Cat-1 was not inactivated or inhibited by substrate, as described for other catalases [4–6,36]. From the Michaelis-Menten or the Lineweaver-Burk plots an apparent V of $1.67 (\pm 0.16) \times 10^6$ U/mg protein was determined. From these data a k_{cat} of 8.9×10^6 s^{-1} and a catalytic efficiency k_{cat}/K_m of 4.11×10^8 $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ was calculated. When assayed at high H_2O_2 concentrations, up to 3 molar H_2O_2 , it also followed Michaelis-Menten kinetics, but with an apparent K_m of 232.6 ± 12.7 mM and apparent V of $9.49 (\pm 0.13) \times 10^6$ U/mg protein (Fig. 5B). In this case the calculated k_{cat} was 5.06×10^7 s^{-1} and the catalytic efficiency k_{cat}/K_m was 2.17×10^8 $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$.

When activity was assayed at different pH values, no optimal pH was observed, but rather the typical plateau described for catalase [37]. Cat-1 was stable and similarly active from pH 4 to pH 12 (Fig. 5C).

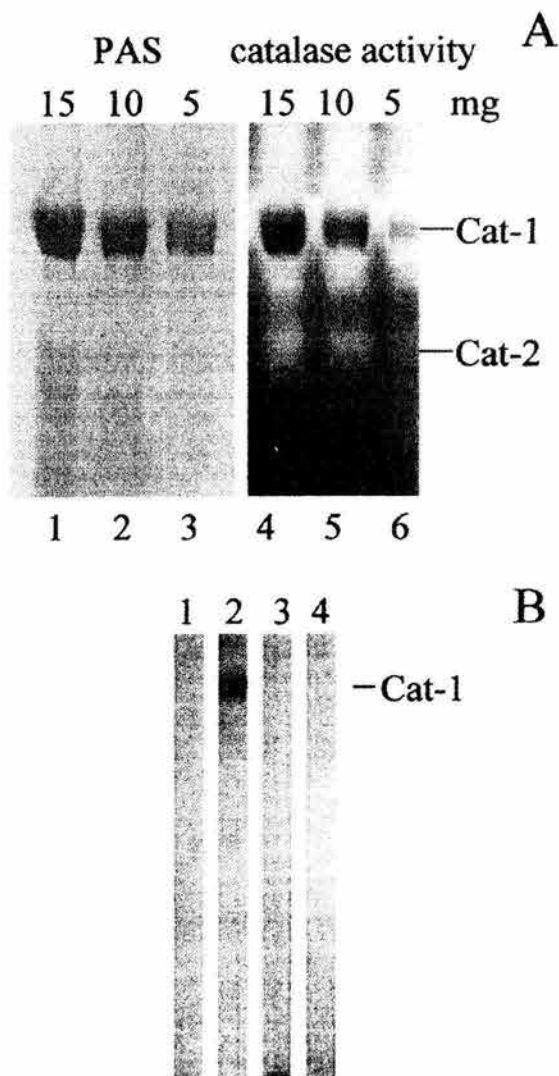


Fig. 3. PAS staining and Concanavaline-A binding of Cat-1. (A) Purified Cat-1 was separated by PAGE and then the gel was cut in two halves, one was stained with the Schiff's reagent (PAS) and the other was developed for catalase activity. Lanes 1 to 3 contain, respectively, 15, 10, and 5 μ g protein in the gel stained with PAS. Protein stained with PAS corresponds to the main catalase activity (unstained regions in the gel) and protein (inside the unstained regions) of lanes 4 to 6, which also contain 15, 10, and 5 μ g protein. Because of overloading, a small amount of another catalase activity is detected (Cat-2). (B) Purified Cat-1 was separated by PAGE and transferred to a nitrocellulose filter. After incubating with α -IgG rabbit-peroxidase, the slides were stained for peroxidase. Lane 1, PBS; lane 2, incubated with Con-A (100 μ g/ml) and α -IgG rabbit-peroxidase; lane 3, Con-A; lane 4, α -IgG rabbit-peroxidase.

Inactivation and inhibition of Cat-1 activity

Monofunctional catalases are inactivated by 3-amino-1,2,4-triazole [31]. Cat-1 was inactivated by 20 mM 3-amino-1,2,4-triazole following first order kinetics ($E_0 \times e^{-kt}$); k was $0.054 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$ (Fig. 6A). Inhibition of 50% of the activity took place in 12.7 min.

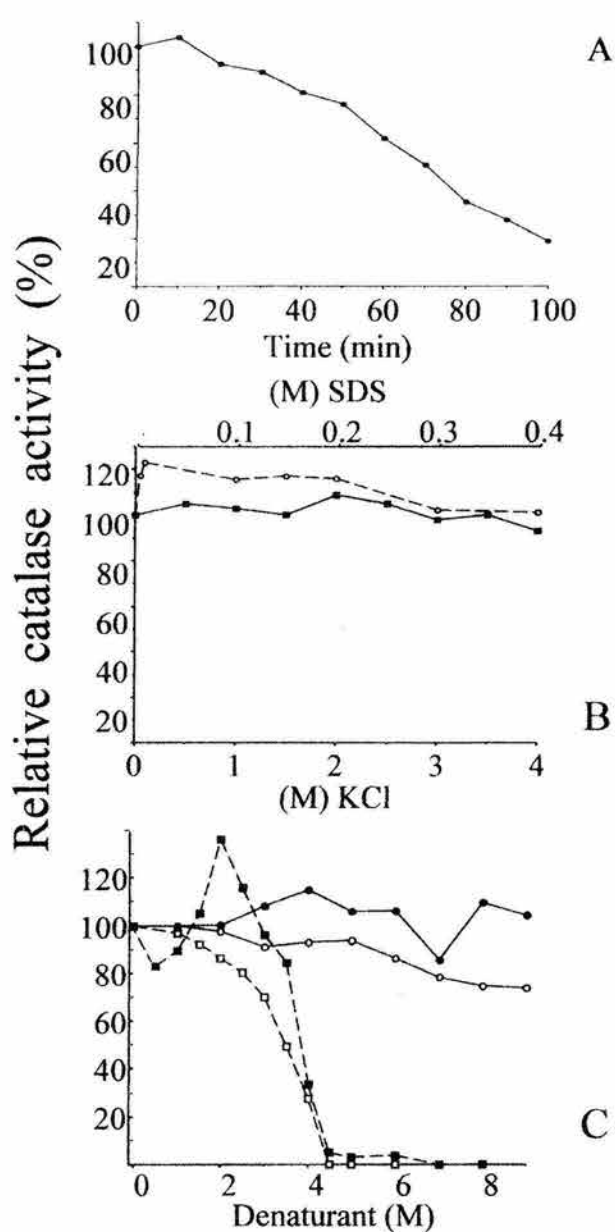


Fig. 4. Cat-1 stability under heat treatment and in the presence of high concentrations of denaturants. (A) Purified Cat-1 was heated at 93°C and activity was then assayed at 22°C. Mean values of two experiments. (B) Cat-1 was incubated 30 min with different concentrations of SDS and then assayed in the presence of the detergent (\circ - \circ). Mean values of two experiments. After incubating the enzyme for 24 h in the presence of different concentrations of KCl the activity was assayed, diluting the salt 20 times (\blacksquare - \blacksquare). Mean values of two experiments. (C) Cat-1 was incubated for 48 h in the presence of different concentrations of urea (circles) or guanidine-HCl (squares). The activity was assayed, diluting the denaturant 20 times (open symbols) or after dialysis (closed symbols). Mean values of four experiments for urea and three experiments for guanidine-HCl.

Azide, an inhibitor of heme-enzymes, was effective at < 1 mM. Inactivation was first order with an apparent

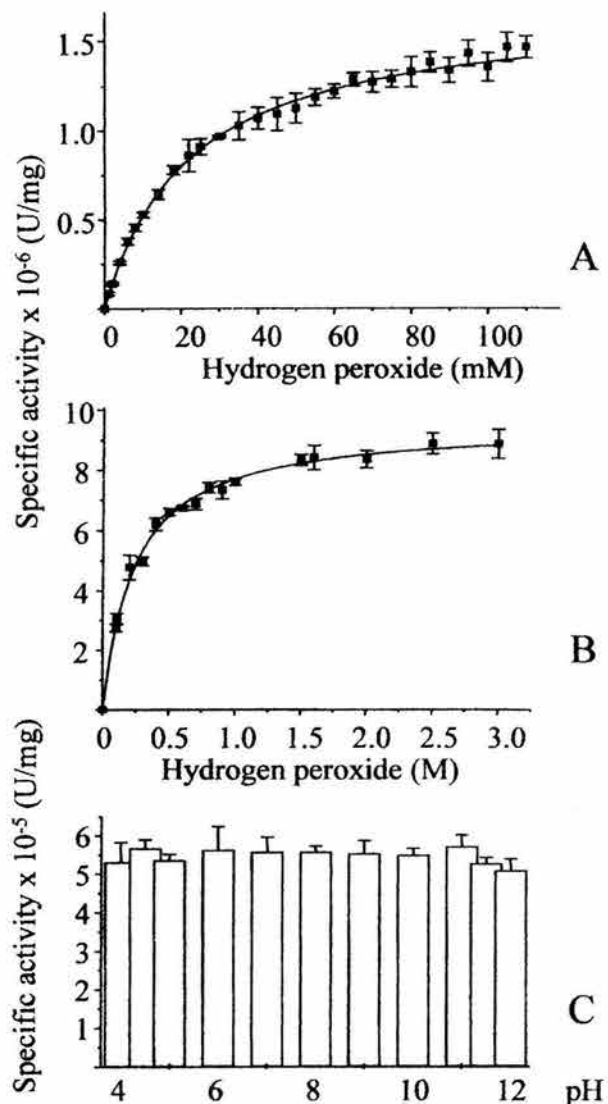


Fig. 5. Cat-1 kinetics in the presence of millimolar or molar concentrations of hydrogen peroxide and activity at a different pH. (A) Specific activity of Cat-1 at less than 100 mM concentration of hydrogen peroxide. K_m was 22 mM and V 1.7×10^6 U/mg protein. Values are means of four or eight determinations from two experiments. (B) Cat-1 specific activity with concentrations from 100 mM to 3 M of hydrogen peroxide. K_m was 233 mM and V 9.5×10^6 U/mg protein. Values are means of three or six determinations from two experiments. (C) Cat-1 specific activity assayed at a different pH with 10 mM hydrogen peroxide (four determinations).

k of $2.11 \pm 0.03 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Fig. 6B). The concentration of azide that caused 50% inactivation, IC_{50} , was 0.33 mM.

Hydroxylamine has been used as a catalase inhibitor. Hydroxylamine inhibition was measured at different concentrations. Cat-1 was sensitive to hydroxylamine in the micromolar range (Fig. 6C). Inactivation was first order with an apparent k of 3.54 ± 0.07

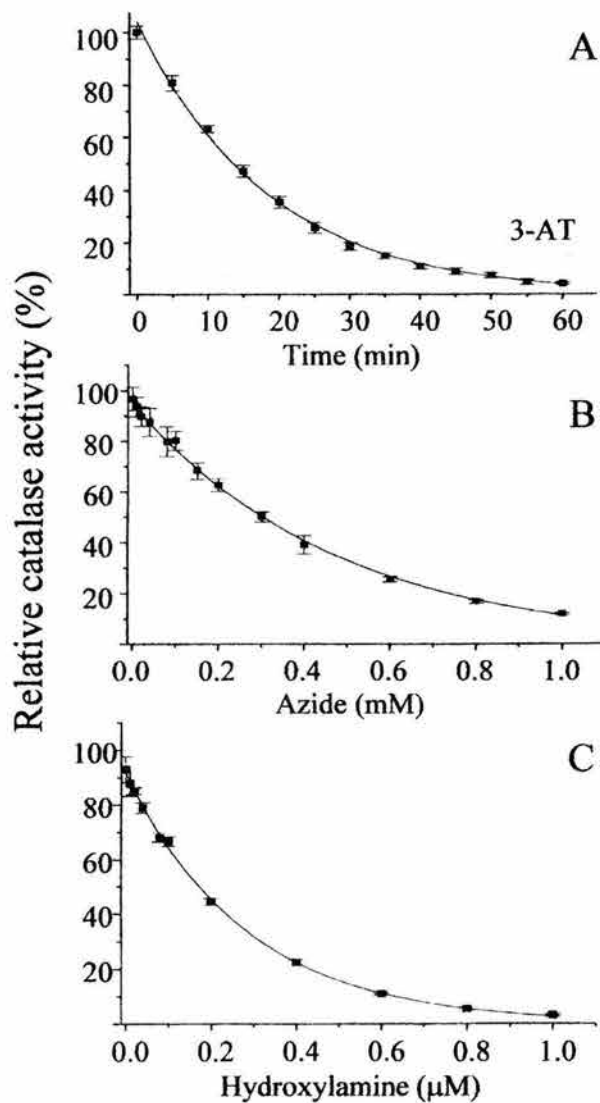


Fig. 6. Inactivation of Cat-1 in the presence of known inhibitors. (A) Time course of Cat-1 inactivation after incubation in the presence of 20 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT). A $k = 0.054 \text{ min}^{-1}$ was calculated. (B) Inactivation of Cat-1 in the presence of different concentrations of azide. The enzyme was incubated 1 min with azide and then activity was assayed with 10 mM H_2O_2 in the presence of azide. An apparent k of $2.11 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ and an I_{50} of 330 μM were obtained. (C) Inactivation of Cat-1 incubated 1 min in the presence of different concentrations of hydroxylamine. The enzyme was incubated 1 min with hydroxylamine and then activity was assayed with 10 mM H_2O_2 in the presence of the inhibitor. An apparent k of $3.54 \text{ } \mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ and an I_{50} were 190 nM were obtained. Each point was determined three times.

$\mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. The IC_{50} for hydroxylamine was 0.19 μM .

KCN binds to the heme enzymes. It is a noncompetitive inhibitor of catalases at low H_2O_2 concentrations and becomes competitive at high concentrations ($> 0.1 \text{ M } \text{H}_2\text{O}_2$) [38]. KCN inhibited Cat-1 completely at millimolar concentrations. At micromolar KCN concentra-

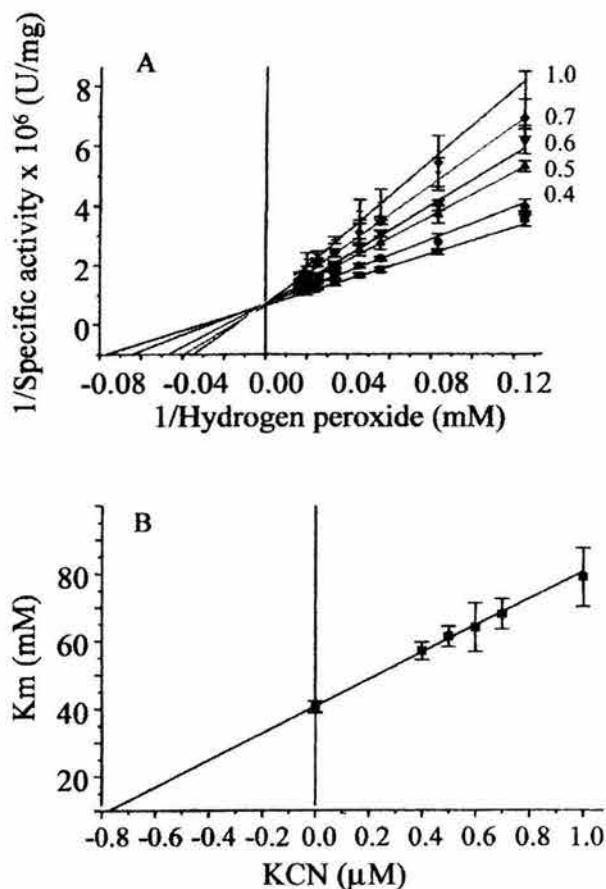


Fig. 7. Inhibition of Cat-1 by cyanide. (A) A double reciprocal (Lineweaver-Burk) plot of Cat-1 activity incubated in the presence of increasing concentrations of KCN gave a V of 1.35×10^6 U/mg protein. Each point was determined three times. (B) K_m was plotted against KCN concentration to obtain an apparent inhibition constant K_i of $0.76 \mu\text{M}$.

tions inhibition was competitive (Fig. 7). An apparent inhibition constant K_i of $0.76 \pm 0.05 \mu\text{M}$ and an IC_{50} of $71 \mu\text{M}$ were obtained.

DISCUSSION

Purification and molecular analysis of Cat-1

With the data of the purification method described and assuming a pure enzyme, Cat-1 in conidia is estimated to be about 0.6% of the total protein. Our method, with some minor modifications (solvent used and concentration of salt for precipitation or for elution from the Phenyl Sepharose column), can be used for the purification of other catalases. Milligram quantities of purified Cat-1 can be obtained from conidia and purification was sufficient to grow crystals. Crystals of Cat-1 were diffracted successfully in a synchrotron, and the resolution of its structure at 1.75 \AA is in course.

Large catalases (> 80 kDa monomers) have a "flavodoxin-like" domain at the carboxyl end [3]. In the Cat-1 three-dimensional structure the same domain at the carboxyl end of the protein was observed. Cross-linking results are in accordance with a tetrameric structure. Glycosylation of the enzyme contributes to the high molecular mass for the tetramer, 354 kDa. From the sequence of the *Cat-1* gene, a molecular mass of 82,268 Da for the subunit was calculated (AY027545). This value together with the chlorin would give a molecular mass of 332 kDa. The amount of hexoses bound to the enzyme and the molecular determination of the chlorin should give us a definitive molecular mass for the enzyme.

Our previous data indicated that the prosthetic group of Cat-1 was a high-spin asymmetric heme, different from the ferroprothemo IX [27]. Mass spectroscopy experiments and the three-dimensional structure of the protein will show us the structure of the chlorin. Preliminary data indicate that the chlorin has a higher molecular mass than protoheme-IX. A chlorin with four carbonyls was reported for the prosthetic group of a *N. crassa* catalase [39,40], which probably corresponds to catalase-3 because only this catalase is induced by nitrate ([40], unpublished results). It is possible that both *N. crassa* monofunctional catalases have the same chlorin. A similar chlorin was reported for a spinach catalase [41].

Cat-1 stability

Cat-1 was more resistant to heat than HPII of *E. coli* [35] and other large catalases of *Aspergilli* [32,33]. Cat-1 resisted treatment with organic solvents such as acetone, hexane, chloroform, and ethanol, but was inactivated by iso-propanol. A "peroxidative" activity with methanol and ethanol as substrates can be detected with monofunctional catalase [42]. The peroxidative activity with iso-propanol could cause inhibition of enzyme activity rather than inactivation due to denaturation, but this has not been sustained experimentally.

Cat-1 was unusually resistant to denaturing agents. It resisted treatment with 9 M urea; bovine liver catalase [35] and porcine erythrocyte catalase [43] are inactivated by 7 M and 4 M urea, respectively. Cat-1 resisted treatment with 3.5 M guanidine-HCl; porcine erythrocyte catalase was completely dissociated with 2.0 M guanidine-HCl [43]. These results make Cat-1 an interesting enzyme for the study of its activity in relation to its dissociation and denaturation with guanidine-HCl and possible renaturation upon dialysis.

High resistance to denaturing by heat or chaotropic agents is due in part to inter-weaving between monomers in monofunctional catalases. The amino-terminal arm of

a monomer slips through the "wrapping domain" of the Q-related subunit and vice versa giving a tetramer of two tightly bound dimers [3]. The extra "flavodoxin-like" domain at the carboxy-terminal may also contribute to the stability to the large catalases.

Carbohydrates bound to the enzyme have been reported to give stability to *A. niger* CatR because oxidation of carbohydrate moieties by periodate lowered stability [32]. However, periodate oxidation also affects some amino acid residues and this could alter protein structure and stability. HP11 is also very stable but probably does not have any carbohydrates bound to its protein [35]. The hexoses bound to Cat-1 are glucose and/or mannose. A catalase from *A. niger* has mainly mannose bound to it [44].

Unusual kinetics

At concentrations of H_2O_2 below 100 mM, the apparent K_m of Cat-1 was 22 mM. However, at molar concentrations of H_2O_2 the apparent K_m was 10 times higher. High (129 mM) [38] and low (25–35 mM) [4,45] K_m values have been reported for beef liver catalase as well as for *A. niger* CatR (322 mM) [6] and (87 mM) [4]. The V and K_m dependence on the initial H_2O_2 concentration was believed to be due to substrate inhibition and enzyme denaturation [45]. Because Cat-1 and CatR are resistant to molar concentrations of substrate, there must be another reason to account for this characteristic of catalases. One explanation for this unusual kinetics is that Cat-1 has two different heme groups, the protoheme IX and the characterized chlorin [27], a situation that has been described for a spinach catalase [41]. However, this explanation does not hold for animal catalases, where no chlorin has been described. Further experiments are required to establish the reason for this kinetic behavior.

Saturation of the active site can only be observed in catalases such as Cat-1 and CatR, that are resistant to high H_2O_2 concentrations. Resistance to H_2O_2 inhibition could be related to a lower formation rate of Compound II and Compound III and a higher rate of conversion of Compound III to the native enzyme compared to bovine liver catalase [6]. However, in nature the enzyme would rarely be exposed to millimolar concentrations of H_2O_2 .

Inactivation and inhibition of Cat-1 activity

Cat-1 showed similar activity at different pH values, from 4 to 12, which is typical for monofunctional catalases, in contrast to catalase-peroxidases, which have an optimal pH. This fact together with the insensibility to some organic solvents and the inactivation by 3-amino-1,2,4-triazole indicates that Cat-1 is a monofunctional catalase [36,37].

At high H_2O_2 /azide concentration ratios, as in our experiments, inhibition of catalase was reported to be mainly due to formation of compound III [46]. At low concentrations of H_2O_2 , catalase metabolizes azide and hydroxylamine by a peroxidating activity, producing nitric oxide [46,47]. Nitric oxide at micromolar concentrations inhibits catalase, but O_2 reverts this effect without damage to the enzyme [48]. Formation of an azidyl radical by a one electron transfer from azide to compound I has been detected [46,49]. The role of the azidyl radical in catalase inactivation is not clear at the moment. Cat-1 was 10 times less sensitive to inactivation by azide than by hydroxylamine. It was also less sensitive to azide than bovine liver catalase [46]. A low sensitivity to azide has been found for *A. niger* CatR [37,50].

KCN inhibited Cat-1 competitively at concentrations of H_2O_2 below 1 μ M. The K_i obtained for Cat-1 is 20–30 times lower than that reported for *E. coli* HP11 [51] and for beef liver catalase [6,38]. This could be related to the chlorin in Cat-1; because modification of the heme *b* into heme *d* in the *E. coli* HP11 increased binding of HCN [51]. The IC_{50} for Cat-1 was similar to that one reported for *Bacillus subtilis* spore catalase [14].

Large catalases

In bacteria, the large catalases described are *E. coli* (HP11 or KatE), *Bacillus subtilis* (KatE), *Bacillus firmus* (KatE), *Mycobacterium avium* (KatE), *Pseudomonas putida* (CatC), and *Xanthomonas oryzae* (KatX) [2]. Fungi sometimes have two large catalases: *N. crassa* (Cat-1 and Cat-3), *Aspergillus nidulans* (CatA and CatB) [10,11], *Aspergillus fumigatus* (CatA and CatB) [52,53]. A *Penicillium vitale* catalase [54], the *Aspergillus niger* CatR [55], and *Claviceps* CPCAT1 [56] are large catalases. They all share high sequence similarity/identity and have a "flavodoxin-like" domain.

Few of these enzymes have been studied from the molecular and kinetic point of view. Conspicuous features of Cat-1 and other large catalases are: withstanding molar concentrations of H_2O_2 [6], thermoresistance ($\geq 70^\circ C$) [32,33,35], enhanced resistance to denaturants [33–35], and lower sensitivity to inactivation by azide than other catalases [44,46,50]. It remains to be seen whether these hold true for other large catalases.

Another feature of catalases that merits further research is the effect on stability and activity of the presence of chlorins and the effect of heme modification by singlet oxygen. HP11 and *P. vitale* catalase have a *cis*-hydroxychlorin γ -spirolactone that probably derives from protoporphyrin-IX (heme *b*) [57]. Cat-1 has a different chlorin [27]. This chlorin is modified by singlet oxygen in vitro [27] and in vivo [24] during cell differentiation and under stress conditions without losing its

activity ([27], unpublished results). Catalase-3 also has a chlorin, possibly the same as Cat-1, and is also modified by singlet oxygen (unpublished results). However, modification by singlet oxygen is not exclusive to catalases with a chlorin moiety; protoheme-IX containing catalases are also modified by singlet oxygen in a similar way [27,58].

Acknowledgements — This research was supported in part by grant number IN214199 from DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México, and grant 25288N from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. We thank Dra. Rosario A. Muñoz and Dr. Armando Gómez-Puyou for critically reviewing the manuscript, and Mark West for correcting the English.

REFERENCES

- [1] Kirkman, H. N.; Rolfo, M.; Ferraris, A. M.; Gaetani, G. F. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J. Biol. Chem.* **274**:13908–13914; 1999.
- [2] Klotz, M. G.; Klassen, G. R.; Loewen, P. C. Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Mol. Biol. Evol.* **14**:951–958; 1997.
- [3] Bravo, J.; Fita, I.; Gouet, P.; Jouve, H. M.; Melik-Adamyany, W.; Murshudov, G. N. Structure of catalases. In: Scandalios, J. G., ed. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997:407–445.
- [4] Vasudevan, P. T.; Weiland, R. H. Deactivation of catalase by hydrogen peroxide. *Biotechnol. Bioeng.* **36**:783–789; 1990.
- [5] Feuers, R. J.; Pattillo, F. M.; Osborn, C. K.; Adams, K. L.; DeLuca, D.; Smith, W. G. Application of an integrated rate equation to the inactivation of catalase. *Free Radic. Biol. Med.* **15**:223–226; 1993.
- [6] Lardinois, O. M.; Mestdagh, M. M.; Rouxhet, P. G. Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* **1295**:222–238; 1996.
- [7] Loewen, P. L. Bacterial catalases. In: Scandalios, J. G., ed. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997:273–308.
- [8] Ruis, H.; Koller, F. Biochemistry, molecular biology, and cell biology of yeast and fungal catalases. In: Scandalios, J. G., ed. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997:309–342.
- [9] Chary, P.; Natvig, D. O. Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock, and development. *J. Bacteriol.* **171**:2646–2652; 1989.
- [10] Navarro, R. E.; Stringer, M. A.; Hansberg, W.; Timberlake, W. E.; Aguirre, J. *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr. Genet.* **29**:352–359; 1996.
- [11] Kawasaki, L.; Wysong, D.; Diamond, R.; Aguirre, J. Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J. Bacteriol.* **179**:3284–3292; 1997.
- [12] Scandalios, J. G.; Guan, L.; Polidoros, A. N. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. In: Scandalios, J. G., ed. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997:343–345.
- [13] Hengge-Aronis, R. Survival of hunger and stress—the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *Escherichia coli*. *Cell* **72**:165–168; 1993.
- [14] Loewen, P. C.; Switala, J. Purification and characterization of spore-specific catalase-2 from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**:3601–3607; 1988.
- [15] Bagyan, I.; Casillas-Martínez, L.; Setlow, P. The *katX* gene, which codes for the catalase in spores of *Bacillus subtilis*, is a forespore-specific gene controlled by *sigmaF*, and *KatX* is essential for hydrogen peroxide resistance of the germinating spore. *J. Bacteriol.* **180**:2057–2062; 1998.
- [16] Willekens, H.; Langebartels, C.; Tiré, C.; van Montagu, M.; Inzé, D.; van Camp, W. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana glauca* (L.). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:10450–10454; 1994.
- [17] Toledo, I.; Aguirre, J.; Hansberg, W. Aerial growth in *Neurospora crassa*: characterization of an experimental model-system. *Exp. Mycol.* **10**:114–125; 1986.
- [18] Springer, M. L.; Yanofsky, C. A morphological and genetic analysis of conidiophore development in *Neurospora crassa*. *Genes Dev.* **3**:559–571; 1989.
- [19] Toledo, I.; Hansberg, W. Protein oxidation related to morphogenesis in *Neurospora crassa*. *Exp. Mycol.* **14**:184–189; 1990.
- [20] Toledo, I.; Noronha-Dutra, A. A.; Hansberg, W. Loss of NAD(P)-reducing power and glutathione disulfide excretion at the start of induction of aerial growth in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **173**:3243–3249; 1991.
- [21] Hansberg, W.; de Groot, H.; Sies, H. Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radic. Biol. Med.* **14**:287–293; 1993.
- [22] Toledo, I.; Aguirre, J.; Hansberg, W. Enzyme inactivation related to a hyperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*. *Microbiology* **140**:2391–2397; 1994.
- [23] Toledo, I.; Rangel, P.; Hansberg, W. Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation. *Arch. Biochem. Biophys.* **319**:519–524; 1995.
- [24] Lledias, F.; Rangel, P.; Hansberg, W. Singlet oxygen is part of a hyperoxidant state generated during spore germination. *Free Radic. Biol. Med.* **26**:1396–1404; 1999.
- [25] Hansberg, W.; Aguirre, J. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell insulation from dioxygen. *J. Theor. Biol.* **142**:201–221; 1990.
- [26] Hansberg, W. A hyperoxidant state at the start of each developmental stage during *Neurospora crassa* conidiation. *Cienc. Cult.* **48**:68–74; 1996.
- [27] Lledias, F.; Rangel, P.; Hansberg, W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* **273**:10630–10637; 1998.
- [28] Vogel, H. J. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implication. *Am. Nat.* **98**:435–446; 1964.
- [29] Zacharius, R. M.; Zell, T. E.; Morrison, J. H.; Woodlock, J. J. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **31**:148–152; 1969.
- [30] Rørth, M.; Jensen, P. K. Determination of catalase activity by means of the Clark oxygen electrode. *Biochim. Biophys. Acta* **139**:171–173; 1967.
- [31] Margoliash, E.; Novogrodsky, A.; Schejter, A. Irreversible reaction of 3-Amino-1:2:4-triazole and related inhibitors with the protein catalase. *Biochem. J.* **74**:339–348; 1960.
- [32] Wasserman, B. P.; Hultin, H. O. Effect of deglycosylation on the stability of *Aspergillus niger* catalase. *Arch. Biochem. Biophys.* **212**:385–392; 1981.
- [33] López-Medrano, R.; Ovejero, M. C.; Calera, J. A.; Puente, P.; Leal, F. An immunodominant 90-kilodalton *Aspergillus fumigatus* antigen is the subunit of a catalase. *Infect. Immun.* **63**:4774–4780; 1995.
- [34] Calera, J. A.; Sánchez-Weatherby, J.; López-Medrano, R.; Leal, F. Distinctive properties of the catalase B of *Aspergillus nidulans*. *FEBS Lett.* **475**:117–120; 2000.
- [35] Switala, J.; O'Neil, J. O.; Loewen, P. C. Catalase HPII from *Escherichia coli* exhibits enhanced resistance to denaturation. *Biochemistry* **38**:3895–3901; 1999.
- [36] Chance, B. The reaction of catalase in the presence of the notatin system. *Biochem. J.* **46**:387–402; 1950.
- [37] Chance, B. Effect of pH upon the reaction kinetics of the enzyme-substrate compounds of catalase. *J. Biol. Chem.* **194**:471–481; 1952.
- [38] Ogura, Y.; Yamazaki, I. Steady-state kinetics of the catalase

- reaction in the presence of cyanide. *J. Biochem. (Tokyo)* **94**:403–408; 1983.
- [39] Jacob, G. S.; Orme-Johnson, W. H. Catalase of *Neurospora crassa*. 2. Electron paramagnetic resonance and chemical properties of the prosthetic group. *Biochemistry* **18**:2975–2980; 1979.
- [40] Jacob, G. S.; Orme-Johnson, W. H. Catalase of *Neurospora crassa*. 1. Induction, purification, and physical properties. *Biochemistry* **18**:2967–2975; 1979.
- [41] Hirasawa, M.; Gray, K. A.; Ondrias, M. R.; Larsen, R. W.; Shaw, R. W.; Morrow, K. J. Jr.; Knaff, D. B. Prosthetic group content and ligand binding properties of a spinach catalase. *Biochim. Biophys. Acta* **994**:229–234; 1989.
- [42] Sichak, S. P.; Dounce, A. L. Analysis of the peroxidatic mode of action of catalase. *Arch. Biochem. Biophys.* **249**:286–295; 1986.
- [43] Takeda, A.; Hirano, K.; Shiroya, Y.; Samejima, T. On the denaturation of porcine erythrocyte catalase with alkali, urea, and guanidine hydrochloride in relation to its subunit structure. *J. Biochem. (Tokyo)* **93**:967–975; 1983.
- [44] Kikuchi-Torii, K.; Hayashi, S.; Nakamoto, H.; Nakamura, S. Properties of *Aspergillus niger* catalase. *J. Biochem. (Tokyo)* **92**:1449–1456; 1982.
- [45] Abe, K.; Makino, N.; Anan, K. pH dependency of kinetic parameters and reaction mechanism of beef liver catalase. *J. Biochem. (Tokyo)* **85**:473–479; 1979.
- [46] Lardinois, O. M.; Rouxhet, P. G. Peroxidatic degradation of azide by catalase and irreversible enzyme inactivation. *Biochim. Biophys. Acta* **1298**:180–190; 1996.
- [47] Mian, K. B.; Martin, W. The inhibitory effect of 3-amino-1,2,4-triazole on relaxation induced by hydroxylamine and sodium azide but not hydrogen peroxide or glyceryl trinitrate in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* **116**:3302–3308; 1995.
- [48] Brown, G. C. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur. J. Biochem.* **232**:188–191; 1995.
- [49] Kalyanaraman, B.; Janzen, E. G.; Mason, R. P. Spin trapping of the azidyl radical in azide/catalase/H₂O₂ and various azide/peroxidase/H₂O₂ peroxidizing systems. *J. Biol. Chem.* **260**:4003–4006; 1985.
- [50] Gruft, H.; Ruck, R.; Traynor, J. Properties of a unique catalase isolated from *Aspergillus niger*. *Can. J. Biochem.* **56**:916–919; 1978.
- [51] Maj, M.; Nicolls, P.; Obringer, C.; Hillar, A.; Loewen, P. C. Reaction of *E. coli* catalase HPII with cyanide as ligand and as inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta* **1298**:241–249; 1996.
- [52] Calera, J. A.; Paris, S.; Monod, M.; Hamilton, A. J.; Debeaupuis, J. P.; Diaquin, M.; López-Medrano, R.; Leal, F.; Latge, J. P. Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **65**:4718–4724; 1997.
- [53] Takasuka, T.; Sayers, N. M.; Anderson, M. J.; Benbow, E. W.; Denning, D. W. *Aspergillus fumigatus* catalases: cloning of an *Aspergillus nidulans* catalase B homologue and evidence for at least three catalases. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **23**:125–133; 1999.
- [54] Vainshtein, B. K.; Melik-Adamyran, W. R.; Barynin, V. V.; Vagin, A. A.; Grebenko, A. I.; Borisov, V. V.; Bartels, K. S.; Fita, I.; Rossmann, M. G. Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **188**:49–61; 1986.
- [55] Fowler, T.; Rey, M. W.; Vähä-Vahe, P.; Power, S. D.; Berka, R. M. The catR gene encoding a catalase from *Aspergillus niger*: primary structure and elevated expression through increased gene copy number and use of a strong promoter. *Mol. Microbiol.* **9**:989–998; 1993.
- [56] Garre, V.; Müller, U.; Tudzynski, P. Cloning, characterization, and targeted disruption of cpcat1, coding for an in planta secreted catalase of *Claviceps purpurea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**:772–783; 1998.
- [57] Murshudov, G. N.; Grebenko, A. I.; Barynin, V.; Dauter, Z.; Wilson, K. S.; Vainshtein, B. K.; Melik-Adamyran, W.; Bravo, J.; Ferrán, J. M.; Ferrer, J. C.; Switala, J.; Loewen, P. C.; Fita, I. Structure of the heme d of *Penicillium vitale* and *Escherichia coli* catalases. *J. Biol. Chem.* **271**:8863–8868; 1996.
- [58] Lledias, F.; Hansberg, W. Oxidation of human catalase by singlet oxygen in myeloid leukemia cells. *Photochem. Photobiol.* **70**:887–892; 1999.

Original Contribution

Functional and structural analysis of catalase oxidized by singlet oxygen[†]

Adelaida Díaz[†], Rosario A. Muñoz-Clares[§], Pablo Rangel[†], Victor-Julián Valdés[†]
and Wilhelm Hansberg^{†*}

*Instituto de Fisiología Celular[†] and Facultad de Química[§], Universidad Nacional
Autónoma de México, México D.F.*

[†] This research was supported in part by grants from Universidad Nacional Autónoma de México, DGAPA (IN214199, IN225402), and from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (33148–N, C01–40697), México. A. D. received a CONACyT Ph. D. scholarship and complementary stipend from DGEP.

RECEIVED DATE:

RUNNING TITLE: Structure and kinetics of an oxidized catalase

* Prof. Wilhelm Hansberg

Instituto de Fisiología Celular,

Universidad Nacional Autónoma de México

Apartado Postal 70-242; 04510 México, D.F. MEXICO

Phone: (5255) 5622 5655; FAX: (5255) 5622 5630

e-mail: whansberg@ifc.unam.mx

Abstract—Purified catalase-1 (CAT-1) from asexual spores of *Neurospora crassa* is oxidized by singlet oxygen giving rise to active catalase conformers with different electrophoretic mobility. These enzyme conformers are detected *in vivo* under stress conditions and during development at the start of the asexual morphogenetic transitions. Here we describe structural and functional comparisons of the non-oxidized (CAT-1a) with the fully oxidized conformers (CAT-1e). Protein fluorescence and circular dichroism of the two conformers were nearly identical, indicating no gross conformational change in CAT-1e. Increased sensitivity to inhibition by cyanide indicated a local change at the active site in CAT-1e. CAT-1e was less resistant to high temperatures, high guanidine-HCl concentration, and digestion with subtilisin. CAT-1e was also less stable than CAT-1a at an acid pH. Using a broad H₂O₂ concentration range (0.01-3.0 M), non-hyperbolic saturation kinetics was found in both conformers, indicating that kinetic complexity does not arise from oxidation at the heme. The kinetics was consistent with the existence of two kinds of active sites differing more than 10-times in substrate affinity. Positive cooperativity for one or both of the saturation curves is possible. Kinetic constants obtained at 22°C of CAT-1e varied slightly and apparent activation energies for the reaction of both components are not significantly different. The overall data show that CAT-1e is structurally different from CAT-1a although it conserves most of the remarkable stability and catalytic efficiency of the non-oxidized enzyme. Because the enzyme in the cell is inevitably oxidized under physiological conditions, preservation of functional and structural catalase properties could have evolutionary and functional implications.

Keywords—heme oxidation, heme *d*, singlet oxygen, catalase stability, two-component saturation kinetics, cyanide sensitivity, *Neurospora crassa*

INTRODUCTION

Many bacteria, fungi, and plants have more than one catalase (EC 1.11.1.6, hydrogen peroxide:hydrogen peroxide oxido-reductase). Catalases are differently regulated and some are related to development [1-13]. Catalase activity during formation of spores (conidia) increases stepwise in the asexual life cycle of *Neurospora crassa*; conidia have 60 times more catalase activity than hyphae growing in a liquid medium. This large increase in catalase activity is due to CAT-1 synthesis during conidia formation and maturation [10]. The activity of another catalase, catalase-3, increases at the end of exponential growth and during adhesion of hyphae [10]. A null mutant strain of catalase-3 increases aerial hyphae and conidia formation [12]. These results support the hypothesis that cell differentiation in *N. crassa* is a response to oxidative stress [14,15] and highlight the importance of catalases in cell differentiation.

Catalase is one of the most efficient enzymes known. Although extensively studied, many open questions remain to be answered for an enzyme that catalyzes an apparently very simple reaction: dismutation of two hydrogen peroxide (H_2O_2) molecules into two water and a dioxygen molecules. Small catalases (subunit of ≈ 60 kDa) are reversibly inhibited and irreversibly inactivated by substrate. In contrast, large catalases (subunit of ≈ 80 kDa) resist molar concentrations of H_2O_2 [16,17]. Resistance to substrate inhibition and inactivation in large catalases is due to a low rate formation of inactive compound II and III [18]. Large catalases are not inhibited by substrate; instead, their activity augments with increasing concentrations of H_2O_2 [16-18]. The mechanisms involved are not known.

CAT-1 is a homotetrameric, glycosylated, and large catalase. It is an enormously efficient enzyme, which is not inhibited by molar concentrations of H_2O_2 . It also exhibits an unusual resistance to denaturation by temperature and

various denaturants [16]. The activity of purified CAT-1 is stable for months. However, the enzyme is irreversibly oxidized in the course of few weeks of storage. This is accompanied by increased enzyme mobility in native PAGE, yet it preserves its molecular mass and its activity. In a zymogram, five activity bands can be observed depending on the degree of oxidation. The less acidic band corresponds to the non-oxidized conformer CAT-1a (pI 5.45), the more acidic band corresponds to the fully oxidized CAT-1e (pI 5.25); CAT-1b to CAT-1d are intermediate conformers [19]. A similar oxidation, completed in hours, instead of weeks, is caused by direct exposure of purified CAT-1a to singlet oxygen. No other reactive oxygen species generated a similar electrophoretic shift [19].

Catalases assayed from bacterial, fungal, plant, or animal sources are likewise oxidized by singlet oxygen producing an increase in enzyme electrophoretic mobility [19]. In *N. crassa*, the large catalase-3 is similarly oxidized by singlet oxygen [10] and a catalase-peroxidase, which is a completely different heme-enzyme, shows a singlet oxygen-induced shift in electrophoretic mobility [19]. However, the electrophoretic shift in these enzymes is much smaller than in CAT-1.

Oxidation of CAT-1 occurs *in vivo* under conditions in which singlet oxygen is generated [20]. Human catalase oxidation takes place in cultures of myeloid cell (U937) when singlet oxygen is generated [21]. In fact, because it is exclusively generated by singlet oxygen, the change in electrophoretic mobility of catalases can be used to detect singlet oxygen formation in cells [22].

A site of modification in CAT-1 is heme: UV-visible absorbance spectra of the heme indicated that modification increased the asymmetry of the heme [19]. The crystal structure of CAT-1 indicates modification of heme *b* to a *cis*-hydroxyl- γ -spirolactone at the porphyrin ring III (heme *d*),[†] like in the two other large catalases, *Escherichia coli* HP11 and *Penicillium vitale*, catalase, whose tri-dimensional structure is known [23]. Heme *b* is oxidized to heme *d* inside the protein; for this

enzyme, activity is required [24]. Our hypothesis is that singlet oxygen at the active site reacts with heme *b* to form heme *d*.† Oxidation of heme *per se* does not change protein charge. Modification of one or few charged amino acid residues, or loss of a charged protein end, could be a reason for the electrophoretic shift, albeit, no modification of amino acids was observed in the crystal structure of CAT-1.† However, the N-terminal loose end in this structure is not visible and a modification at a residue located in this end might have taken place. Another possibility is that heme modification causes a structural change that modifies the charge of the protein.

To investigate the structural and functional consequences of catalase oxidation, we compared some structural properties, the stability, and the kinetics of the non-oxidized enzyme (CAT-1a) with those of the fully oxidized one (CAT-1e). The results show that CAT-1e is structurally different from CAT-1a. Both conformers exhibited complex saturation kinetics by H_2O_2 with similar kinetic constants and activation energies. Although differences in stability between these conformers were detected under extreme situations, Cat-1e conserves most of the remarkable stability and catalytic efficiency of the non-oxidized enzyme.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains and culture conditions

N. crassa, wild type strain 74–OR23–1A from the Fungal Genetic Stock Center, was grown from stocks of conidia kept in distilled water at -70°C . Conidia were inoculated on agar minimal-medium of Vogel supplemented with 1.5% sucrose. Cultures were grown for 3 days in the dark at 30°C followed by 2 days in the light at 25°C .

Purification of CAT–1

CAT–1 was purified from conidiated aerial mycelium as described previously [16,19]. Briefly, cultures were harvested directly in acetone and collected by filtering through filter paper. Dried acetone powders were ground with glass beads in a cold buffer containing protease inhibitors and antioxidants. Cell extract was frozen and thawed twice and, after centrifugation, the supernatant was precipitated with cold acetone. The resuspended pellet was centrifuged and the supernatant was precipitated with 35% (w/v) ammonium sulfate. The dissolved pellet was passed through a Phenyl Sepharose CL–4B (Pharmacia) column and eluted with 10 mM phosphate buffer, pH 7.8 (adjusted by mixing Na_2HPO_4 and KH_2PO_4 solutions). The purified enzyme gave a yield of 48% of the total cell extract activity and an increase in catalase specific activity of 170 times. After PAGE with sodium dodecyl sulfate (SDS) and staining the gel with Coomassie Brilliant Blue, the preparation showed a principal band of 88 kDa and a few very minor bands [16].

Modification of CAT–1a into CAT–1e

Catalase modification occurred during storage. After eight weeks storage in 50 mM phosphate buffer (adjusted by mixing Na_2HPO_4 and KH_2PO_4 solutions) (PB)

at -20°C most of the catalase activity is CAT-1e and no further shift in electrophoretic mobility is observed. Conformers have the same molecular mass but different electrophoretic mobility. Oxidation of the enzyme can be delayed under an argon atmosphere [19].

Protein determination

Protein in fractions of purified CAT-1 was determined by its absorbency at 280 nm utilizing an extinction coefficient of $88,810\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, which was calculated from the protein sequence [25]. Similarly, an extinction coefficient of $24,870\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ was used for subtilisin.

Spectra

Protein fluorescence spectra of CAT-1, $150\text{ }\mu\text{g/ml}$ in PB, at 25°C , were obtained by exciting protein residues at a wavelength of 280 nm and detecting emission between 300 and 400 nm.

Heme fluorescence emission spectra were carried out at 25°C using 5 mg of total catalase protein in PB, by exciting at 400 nm and measuring emission between 420 and 700 nm.

Circular dichroism spectra of CAT-1, $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ in PB, were obtained in the range of 185 to 250 nm using a 0.1 path cuvette at 25°C , and expressed in molar ellipticity (Θ) ($\text{degrees cm}^2\text{ dmol}^{-1}$). The amount of structure was determined using the software Prosec.

Gel electrophoresis

Minigels ($8 \times 9\text{ cm}$ and 0.75 mm thick, 8% polyacrylamide 0.2% bis-acrylamide) were used for detection of catalase activity bands. They were made according to the Laemmli procedure, without boiling the samples, and without β -

mercapto-ethanol. Gels were run at 150 V for 2.5 h and immediately after electrophoresis stained for catalase activity.

Catalase activity in polyacrylamide gels was assayed as described [19]. After electrophoresis the gel was briefly soaked in 5% (v:v) methanol and after rinsing with tap water, it was incubated for 10 min in 10 mM H₂O₂. For staining, the gel was incubated in a 1:1 mixture of freshly prepared 2% (w:v) potassium ferric cyanide and 2% (w:v) ferric chloride. Blue color developed in the gel except at the zones where H₂O₂ was decomposed by catalase. Staining was stopped by soaking the gel in a 10% (v:v) acetic acid and 5% (v:v) methanol solution.

CAT-1 thermal and chemical stabilities

CAT-1 (7 µg in 20 µl PB) was incubated for 1 h at different temperatures and the remaining activity and protein were analyzed by PAGE (5 µg in each lane) under non-denaturing conditions as described above. CAT-1 (10 µg in 20 µl PB) was incubated with different concentrations of guanidine-HCl (Boehringer Mannheim) for 72 h at room temperature to reach equilibrium. Samples were divided in two and subjected to PAGE under non-denaturing conditions (5 µg per lane). One gel with 0.3 µg per lane was stained for activity; the other with 5 µg per lane was stained with Coomassie Brilliant Blue.

Subtilisin treatment

Subtilisin (7.5 µg in 2.5 µl PB) was added to 50 µg of CAT-1 in 20 µl PB and the mixture incubated at 30°C during 28 h. At the indicated times, 1.5 µl of 1 M phenyl-methylsulfonyl fluoride in dimethylsulfoxide was added to stop the reaction and catalase activity was determined by oxymetry, using 2 µg, and by zymograms, using 1 µg of CAT-1. The products of proteolysis of 5 µg of CAT-1 were analyzed by SDS-PAGE [26].

Enzyme Assays

Catalase activity was measured at 22°C by determining the initial rate of O₂ production with a Clark electrode [27]. Reaction was started by injecting catalase, either 0.2 µg in 5 µl or 0.04 µg in 1 µl, into a sealed chamber filled with 2 ml of a known concentration of H₂O₂ in PB. Final concentration of catalase was 1.5 nM. H₂O₂ concentration was determined spectroscopically at 240 nm considering an extinction coefficient of 35.76 M⁻¹ cm⁻¹. One unit of activity is defined as the amount of enzyme that catalyzed the consumption of 1 µmol H₂O₂ per min under our experimental conditions.

The reversible inhibition of CAT-1 (0.2 µg in 5 µl PB) by potassium cyanide (KCN) (Merck) was measured at 22°C using different concentrations of the inhibitor (0.4-1.0 µM) and different concentrations of H₂O₂ (8-60 mM). Final concentration of catalase was 1.5 nM. Irreversible inactivation of CAT-1 by 3-amino-1,2,4-triazole was studied at 37°C by incubating 20 µg of the enzyme in 1 ml PB, containing 20 mM 3-amino-1,2,4-triazole, 4 mM ascorbate and 4 mM H₂O₂ [28]. Final concentration of catalase was 150 nM. Samples (50 µl) were withdrawn every 5 min from the incubation mixture and the remaining activity was assayed as stated above. For determination of the concentration of azide or hydroxylamine giving half maximal inactivation, *I*₅₀, CAT-1 (1 µg in 2 ml) (3 µM) was incubated at 37°C for 1 min in the presence of several concentrations of the inhibitors and the remaining activity was measured by adding to the mixture 10 mM H₂O₂.

For determination of the pH dependence of enzyme activity, a mixture of 50 mM each of the following buffers 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (MES), 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), 2-(N-Cyclohexylamino)ethanesulfonic acid (CHES) and 3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid (CAPS) was adjusted to the desired pH with 0.5 M HCl or NaOH, as required. Catalase activity was assayed with 10 mM H₂O₂. To measure

CAT-1 stability in acid, the enzyme was incubated for 5 min at the indicated acidic pH (acetate buffer 50 mM) and the remaining activity determined at the usual pH and with 10 mM H₂O₂. Activity assayed at pH 7.8 in 50 mM phosphate buffer was taken as 100%.

The activation energy, E_a , was determined by measuring the initial velocities at temperatures between 15 and 35°C, in increments of 5 °C, using for k_{cat} determination a H₂O₂ concentration range between 20 and 700 μM.

Materials

Chemicals were from Sigma unless otherwise stated.

RESULTS

Singlet oxygen reacts at the active site of CAT-1 and induces the formation of an active conformer that contains heme *d* instead of heme *b* and exhibits a shift in electrophoretic mobility [19]. The effect of these changes on the structural and functional properties of CAT-1 was studied.

Structural properties of CAT-1 conformers

To test if there is a gross conformational change in CAT-1e, fluorescence emission spectra of CAT-1a and CAT-1e were recorded. The two enzymes exhibited an emission maximum at 334 nm. There were no differences between the two catalase conformers (not shown).

We also recorded the circular dichroism spectra for both enzyme conformers. We found a slight but not statistically significant decrease in the amount of α -helix in CAT-1e (16.60 ± 1.96) compared to CAT-1a (18.85 ± 1.89). Determination of β -bands in CAT-1e (50.29 ± 3.50) and CAT-1a (46.19 ± 2.87) was not accurate enough to detect small differences between conformers. Turns in CAT-1e (8.21 ± 0.83) and CAT-1a (9.18 ± 0.54) and random structure in CAT-1e (24.90 ± 1.58) and CAT-1a (25.78 ± 1.25) were also similar. Thus, the protein fluorescence and circular dichroism spectra did not reveal gross conformational differences between the oxidized and the non-oxidized conformer.

CAT-1 conformers stability

CAT-1 is very resistant to heat inactivation [16]. In an attempt to make evident a likely although minor structural change in CAT-1e, enzyme conformers were incubated for one hour at a high temperature (80 to 93°C) and then analyzed by PAGE under non-denaturing conditions. Although a tetrameric conformation is

detected in CAT-1 with cross-linking agents [16], we detected only the dimeric form of the enzyme with native PAGE. The dimers were stable and fully active. CAT-1e monomers were observed at a temperature of 85°C and above, while CAT-1a monomers were observed at 90°C and above (Fig. 1A), indicating a higher thermal stability of CAT-1a than CAT-1e.

Treating catalase conformers with guanidinium-chloride also revealed CAT-1 high resistance to denaturation [16]. Both enzyme conformers conserved their activity after 48 h exposure to 3.5 M guanidinium chloride. At 4 M guanidinium chloride, CAT-1a still had some active dimers, while the entire CAT-1e was found as monomers (Fig. 1B) and no activity was detected. Thus, CAT-1a was more resistant than CAT-1e to dissociation with guanidinium.

CAT-1 conformer sensitivity to proteolysis was tested with subtilisin. Loss of enzyme activity in CAT-1e followed first order kinetics and occurred significantly faster (50% loss in 2.76 h) than in CAT-1a (50% loss in 5.37 h) (Fig. 2A). In the first 30 min, subtilisin treatment of both conformers generated partially digested but fully active dimers that contained polypeptides of 63 kDa when analyzed with SDS-PAGE; active polypeptides of even lower molecular mass (49-51 kDa) were revealed (Fig. 2B). Loss of the 63 kDa polypeptide, determined by densitometry of the Coomassie stained band, followed first order kinetics and was faster when derived from CAT-1e (50% loss in 4.3 h) than from CAT-1a (50% loss in 7.9 h) (Fig. 2C). Thus, kinetics of both loss of activity and of the 63 kDa polypeptide were faster when derived from the CAT-1e conformer than from the CAT-1a.

Hence, although there was no gross conformational change in CAT-1e, a more subtle change in the enzyme became evident when exposed to high temperature, high concentration of guanidine-HCl and proteolysis.

pH effect on conformers' stability

CAT-1e was less active than CAT-1a at the extreme pH values, 4-4.5 and 11.5-12 (Fig. 3A). Stability of the enzyme was assayed in the acid pH range. CAT-1e in the pH range from 4 to 6 was less stable than CAT-1a, while no difference was found at pH 7.8 (Fig. 3B). This is in accordance with data showing that CAT-1a remains active after native PAGE with an initial pH of 3.8; CAT-1e was inactivated under these conditions (not shown). Thus, a structural change in the oxidized CAT-1 turned the enzyme unstable at acidic pH.

Heme fluorescence of CAT-1 conformers

Because we detected a site of singlet oxygen oxidation at the heme [19], we analyzed heme fluorescence in CAT-1a and CAT-1e. Due of the very high absorbency of the iron, a high concentration of protein was used to detect heme fluorescence. CAT-1 was purified and concentrated to 5 mg/ml and its fluorescence was obtained immediately after purification, and again after one and eight-week storage. After one week, CAT-1 was partially oxidized (CAT-1c); after eight weeks, it was fully oxidized (not shown) [19]. CAT-1 heme was excited at 400 nm and its fluorescence emission was recorded between 420 and 700 nm. Heme fluorescence exhibited peaks at 465, 574-578, 615 and 642-646 nm with a shoulder at 502-510 nm and minima at 570, 600 and 630 nm (Fig. 4). In the partially oxidized CAT-1c, there was an increment in fluorescence in the span of 560 to 700 nm; in the fully oxidized conformer there was a further increase in fluorescence between 480 and 520 nm. These results may suggest a local change at the active site that occurs in more than one step [19].

Effect of inhibitors on conformers' activity

Different catalase activity inhibitors were used to detect differences between the non-oxidized and the fully oxidized CAT-1 conformers. The irreversible specific inhibitor of catalases 3-aminotriazole, at 20 mM, inactivated both CAT-1a and CAT-1e following pseudo-first order kinetics. The residual activity data were fitted by nonlinear regression to a single exponential decay equation:

$$E_t/E_0 = \exp(-kt) \quad (1),$$

where E_t and E_0 are the enzyme activities at time t and zero, respectively, k is the pseudo-first-order rate constant of inactivation, and t is the time of incubation. The best fit gave estimated values for k of $0.054 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$ for CAT-1a and $0.052 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$ for CAT-1e. From these values, it was calculated that inhibition of 50% of the activity took place in 12.7 min for CAT-1a and 13.4 min for CAT-1e; these values are similar to the reported value for beef liver catalase [28].

Azide, another irreversible inhibitor of heme-enzymes, was effective at concentrations $<1 \text{ mM}$. In this case, kinetics of inactivation was studied by incubating the enzymes with several concentrations of the inhibitor for a fixed time. Inactivation also was pseudo-first order and the experimental data (not shown) fitted very well to equation 2,

$$E_t/E_0 = \exp(-k'It) \quad (2),$$

where k' is the second order rate constant of inactivation, and I is the inhibitor concentration. The estimated values for k' were $2.11 \pm 0.03 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ for CAT-1a and of $1.83 \pm 0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ for CAT-1e. The concentration of inhibitor producing 50% of inhibition after 1 min incubation with the enzyme, I_{50} , was $330 \text{ }\mu\text{M}$ for CAT-1a and $380 \text{ }\mu\text{M}$ for CAT-1e.

Inactivation kinetics by hydroxylamine, another irreversible inhibitor of catalases, were pseudo-first order (not shown) with second-order rate constant, k' , values of $3.54 \pm 0.07 \text{ }\mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ for CAT-1a and of $3.32 \pm 0.11 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ for

CAT-1e. The I_{50} for hydroxylamine after 1 min incubation was 0.19 μM for CAT-1a and of 0.20 μM for CAT-1e.

Cyanide binds reversibly to heme-proteins. It is a non-competitive inhibitor of catalases at low H_2O_2 concentrations and competitive at high ($>0.1 \text{ M}$) H_2O_2 concentrations [29]. Inhibition of CAT-1 by KCN at micromolar concentrations was competitive even at the low H_2O_2 concentrations assayed (8-60 mM) (not shown). Replots of the apparent K_M values, obtained in the presence of the inhibitor, versus inhibitor concentration were linear, indicating total inhibition and non-cooperative binding of cyanide ion to the enzyme. The inhibition constant, K_i , was estimated by a lineal fitting of the apparent K_m data in [Figure 5](#) to equation:

$${}_{app}K_m = K_m (1 + I/K_i). \quad (3)$$

CAT-1e was slightly more sensitive to KCN inhibition than CAT-1a: $K_i = 0.76 \pm 0.05$ and $0.28 \pm 0.03 \mu\text{M}$, respectively. Of the different inhibitors assayed, only KCN revealed a higher sensitivity in CAT-1e, which might be indicative of a local change at the active site of the oxidized conformer.

Saturation kinetics of the CAT-1 conformers

Different to small catalases and similar to other large catalases [17], CAT-1 is resistant to molar concentrations of H_2O_2 [16]. Catalase activity with increasing H_2O_2 concentration does not follow Michaelis-Menten kinetics [17,18]. Because they are not inhibited or inactivated by substrate, CAT-1 and other large catalases are amenable to a careful kinetic analysis extending in a very wide range of substrate concentration. Saturation kinetics of both conformers of CAT-1 by H_2O_2 was complex and could be divided into two components. The initial velocity data obtained in the range of 10 mM to 3 M H_2O_2 concentration gave a good fit to equation 4, which is the result of adding two Hill equations:

$$v = \{V_{max(1)}S^{n(1)}/(S_{0.5(1)}^{n(1)} + S^{n(1)})\} + \{V_{max(2)}S^{n(2)}/(S_{0.5(2)}^{n(2)} + S^{n(2)})\} \quad (4),$$

where v is the initial velocity, $V_{max(1)}$ and $V_{max(2)}$ are the maximal velocities of each component, $S_{0.5(1)}$ and $S_{0.5(2)}$ are the concentrations of substrate producing half maximal velocity, and $n_{(1)}$ and $n_{(2)}$ are the Hill numbers.

Figure 6 shows the experimental data and the theoretical lines resulting from the global fit of the 36 activity determinations; the estimated kinetic parameters are given in Table 1. In order to better depict the goodness of the fit to our data, the log of substrate concentration is given in the plots of Fig. 6, as we used a very broad range. The theoretical global curve resulting from the best fit to equation 3, with Hill numbers of 1.2 and 1.7 for the first and second component of the saturation curve, is shown as a solid line. Dashed lines are the individual theoretical curves for each component (Fig. 6A and B). The second best fit for the whole set of data was to a two-component equation without cooperativity. Residuals (differences between theoretical and experimental values), given below the activity versus $\log(\text{H}_2\text{O}_2$ concentration) plots in Figure 6, show that a two-component equation, either with or without cooperativity, gave a much better fit to the whole set of data than a single Michaelis-Menten equation. Thus, the saturation kinetics of CAT-1 by H_2O_2 appears to have two components, and are consistent with the existence of two kinds of active sites, either in the same or in separate enzyme molecules, differing more than 10-times in substrate affinity. One of the active sites is saturated in a low H_2O_2 concentration range and the other in a high concentration. Both components appear to have a positive cooperativity, which is higher in the second component. Compared to CAT-1a, the kinetics of CAT-1e were slightly different: both $S_{0.5}$ values were somewhat higher and both catalytic efficiencies, $k_{cat}/S_{0.5}$, were consequently lower but not significantly different (Table 1).

Apparent activation energy of CAT-1 reaction

The dependence of k_{cat} on temperature was determined for the two conformers using the Arrhenius equation:

$$\ln k_{\text{cat}} = -Ea/RT + \ln A \quad (5)$$

where R is the universal gas constant, T is the absolute temperature in Kelvin, and A is the Arrhenius constant. In the temperature range used, all initial velocity data fitted well to the double Hill equation, equation 4, with Hill numbers of 1.2 and 1.7 for the first and second component, respectively. Arrhenius plots (not shown) were linear and gave apparent activation energies of 19.6 ± 1.5 and 17.5 ± 6.2 kcal/mole for the first and second component, respectively, of CAT-1a, and of 16.7 ± 2.3 and 21.1 ± 3.6 kcal/mole for CAT-1e. Thus, the local change at the active site promoted by oxidation did not significantly alter the kinetic constants nor the apparent activation energies of the reaction catalyzed by CAT-1e.

DISCUSSION

The evidence presented here indicates that the fully oxidized enzyme conformer, CAT-1e, is structurally and functionally different from the non-oxidized one, CAT-1a. The lower stability of CAT-1e in acidic pH and its lower resistance to high temperature, guanidine-HCl, and subtilisin treatment indicate structural differences. Furthermore, the heme fluorescence emission spectra indicated a local change at the active site. This local change at the active site has functional consequences as evidenced by an increased sensitivity to KCN inhibition and slightly altered kinetic constants. Other data, such as inactivation by other catalase inhibitors, circular dichroism measurements, and protein fluorescence spectra did not denote differences between the non-oxidized and oxidized conformers.

Stability of CAT-1

The stability of CAT-1 is remarkable. Global structure remains the same after half an hour at 90°C and 48 h in 3.5 M guanidine-HCl without loss of activity. CAT-1 is more stable than other catalases [16]. Stability of CAT-1 is probably related to the conidium where it accumulates. Conidia are formed as a response to oxidative stress [12,14,15]. They also have to contend during germination with a high concentration of H₂O₂ from plant substrates that can have active NADPH oxidase and produces large amounts of H₂O₂ [30]. The high concentration of CAT-1 in conidia (0.6% of total protein) and its endurance to denaturation and resistance to high concentration of H₂O₂ enables the survival and germination of the conidium under adverse conditions. In fact, conidia of an *Aspergillus nidulans* mutant strain in the homologous catalase are sensitive to H₂O₂ [5] and thermolabile [31].

CAT-1e is less stable than CAT-1a at high temperature, at 4 M guanidinium, or at acidic pH. This indicates that changes produced by oxidation make the enzyme

less stable under extreme conditions. These results are in accordance with the lack of gross alterations of the protein structure as indicated by protein fluorescence and circular dichroism.

As single oxygen reacts rapidly with amino acid residues, particularly Trp, Tyr, His, Met Cys, in addition to the heme ring, damage to other residues in the protein is probable. This may be heterogeneous and present at low level and hence be difficult to detect. Such protein damage may be the cause of the enhanced protein instability.

Because the protein N-terminus is buried in the central part of the tetramer and is essential for activity and stability of the dimer [32]†, digestion of the N-terminus by subtilisin without loss of enzyme activity is limited to a loose end, of about 4 kDa. Thus, to give an active 63 kDa polypeptide, proteolysis of the protein has to occur at the C-terminus. Because the increased instability to subtilisin took place after the subunits were processed to the active 63 kDa polypeptide, which lacks the C-terminus, these results suggest that the CAT-1e increased instability does not reside at the C-terminus.

The C-terminal "flavodoxin like" domain has a mass of 19.5 kDa. A truncated subunit without this domain would give a 62.7 kDa polypeptide, similar in mass to the one obtained with subtilisin, indicating that the C-terminal domain is dispensable for enzyme activity. The resulting active enzyme would be similar to the small catalases with a mass of 60 kDa. Because smaller polypeptides (49-51 kDa) were also detected in active dimers digested by subtilisin, the helix domain (6.6 kDa) that precedes the C-terminal domain is probably also not essential for activity.

Local change at the heme

Fluorescence of the heme may indicate a localized change at the active site. During the first week storage, the fluorescence emission increased mainly between

560 and 700 nm and thereafter between 480 and 520 nm. This is in agreement with the notion that modification of the heme occurs in sequential steps [19]: singlet oxygen attack of porphyrin ring III at the double bond between C5 and C6 produces a transient endoperoxide, whose breakage generates two *cis*-hydroxyl groups at these carbons, leading to the formation of γ -spirolactone between the propionate and the hydroxyl group at C5 and liberating a water molecule. The first two steps could be related to the increase in fluorescence emission at the higher wavelengths; the third step at the lower wavelengths. However, because increase in fluorescence is small and across a wide range of wavelengths, no solid conclusion can be taken from these spectra.

CAT-1e is more sensitive to cyanide than CAT-1a. Because cyanide binds to the heme, these differences indicate a modification at the active site. In an *E. coli* HP11 mutant enzyme, with a substitution of the active site asparagine (N201) for alanine or glutamine, only small changes in cyanide affinity were observed. However, upon modification of heme *b* to heme *d*, binding of cyanide to the active site increases [33]. Thus, oxidation of the porphyrin ring in HP11 and in CAT-1 can affect sensitivity to cyanide.

Compared to other large catalases, *Aspergillus niger* CatR and *E. coli* HP11, CAT-1 sensitivity was less than HP11 and more than CatR to cyanide, less to azide, and similar to hydroxylamine [17].

CAT-1 complex kinetics

A double Hill equation accounts for CAT-1 kinetics in a two orders of magnitude-range of H_2O_2 concentration. Both, a Hill number of 1 or of 1.2 and 1.7 for the first and second component, respectively, gave good theoretical fits to the whole set of experimental data of both conformers. The contribution of the second saturable component to the reaction velocity is negligible at H_2O_2 concentrations

below 100 mM, but it starts to appreciably contribute at concentrations above 250 mM. Thus if the low substrate concentration range is used, as we did in the KCN-inhibition experiments, the initial velocity data would not deviate significantly from a hyperbolic, michaelian, saturation kinetics. Compared to CAT-1a, we found a small change in the two $S_{0.5}$ values of CAT-1e, which might be indicative of a local change at the active site, but the k_{cat} of both conformers were similar.

Some kinetic constants for CAT-1 (Table 1) differ from the reported ones for an inducible *N. crassa* catalase [34], that is probably a mixture of CAT-1 and CAT-3 [10]. A K_m of 25 mM, similar to our $S_{0.5(1)}$ value of 21 mM, was obtained using a single substrate concentration, 14 mM, which is non-saturating for the first H_2O_2 -saturation component of the CAT-1. However, from the k_{cat}/K_m of $4.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ we calculated a k_{cat} of $0.12 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, which is 97 times less than the k_{cat} determined for the first component of CAT-1a (Table 1). For *A. niger* CatR, reported K_m values are 322 mM, using a H_2O_2 -concentration range of 0.1 to 2 M [18] and 465 mM, using <400 mM concentrations [17], which are comparable to our $S_{0.5(2)}$ value of 570 mM. However, the reported k_{cat}/K_m values for CatR are $0.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [17] and $7.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [35], which are, respectively, 54 and 70 times smaller than the CAT-1 values (Table 1). The calculated k_{cat} value from the reported k_{cat}/K_m and K_m [17] is $2.79 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, 67 times smaller than our $k_{\text{cat}(2)}$ value. The different kinetic parameters of these and other reports compared to those obtained for both conformers of CAT-1 could be due to both the different method used to obtain them, a non-linear fit to a two-component Hill equation in our case (equation 4) and the extrapolation of $1/v$ vs. $1/[\text{H}_2\text{O}_2]$ in the other reports [17,34], and to the H_2O_2 -concentration range used in the determination of the saturation kinetics.

There are no E_a values reported for the catalytic steps to compare the apparent E_a values for k_{cat} of CAT-1. There are however reports on the apparent E_a for H_2O_2

binding. Estimated from our Arrhenius plots of $\ln(k_{\text{cat}}/S_{0.5})$ versus $1/T$, the apparent E_a for H_2O_2 binding were 4.2-6.8 kcal/mol for CAT-1a and 4.5-5.5 kcal/mol for CAT-1e. Compared to these values, the reported E_a of 7.2 kcal/mol for the above mentioned *N. crassa* catalase [34] is similar, and the E_a of 2.6 kcal/mol for CatR [35] is somewhat lower.

The apparent E_a for the k_{cat} values for both components of the saturation kinetics of CAT-1e are similar to those of CAT-1a, indicating that the transition state of the rate-limiting step in the catalyzed reaction, if there is one, is not importantly destabilized nor stabilized by oxidation of the enzyme. The similar E_a values for $k_{\text{cat}}/S_{0.5}$ also indicate no significant differences in the binding of substrate between the non-oxidized and oxidized conformers of CAT-1. Taken together, the conformers show no important kinetic differences between them.

Non-hyperbolic kinetics as those found here for both conformers of CAT-1 could arise from different mechanisms. They can result from negative cooperativity between active sites in the same enzyme molecule or from the existence of active site heterogeneity, due to either asymmetry in one enzyme molecule or to different enzyme forms. However, there is no indication of isoenzymes in our enzyme preparation, and the conformer that result from oxidation exhibits the same non-hyperbolic kinetics than the reduced enzyme. Therefore, heterogeneity of active sites, if this is the cause of the observed kinetics, does not arise from oxidation.

Non-hyperbolic kinetics may have a kinetic origin. The reaction catalyzed by catalases involves the ordered addition of two substrate molecules, although both are H_2O_2 . The chemical mechanism is consistent with a Ping-Pong kinetic mechanism where the product released in the first partial reaction is H_2O and H_2O and O_2 are released in the second one. In this kinetic mechanism, if any of the product-release steps is rate limiting, "substrate activation" can arise by an alternative and faster product release pathway involving the previous formation of

an abortive ternary complex between the substrate and the enzyme-product complex. This would also give non-hyperbolic kinetics as those observed in CAT-1. This kinetic mechanism can result in substrate inhibition, if the release of the product from the abortive ternary complex enzyme-product-substrate is slower than that from the binary complex enzyme-product, which could be related to the substrate inhibition observed with small catalases. However, substrate inhibition in small catalases was explained by the formation of inactive compound II and III [18]. Our results do not allow us to conclude whether the complex H_2O_2 saturation kinetics of CAT-1, and most likely the similar kinetics exhibited by other large catalases [17,18], are due to (i) negative cooperativity between interacting active sites, (ii) the existence of two kinds of active sites, or (iii) have a kinetic origin, as a mechanism involving a faster product-release pathway induced by high substrate concentrations. Whatever the reason for these complex kinetics, it is clear that Cat-1, and the other large catalases, have evolved a mechanism which enables them to catalyze the dismutation of very high H_2O_2 concentrations with catalytic efficiencies only one order of magnitude smaller than those attained at low H_2O_2 concentrations.

Physiological and evolutionary implications of heme oxidation

Oxidation of the heme in catalases is probably inevitable. Because of the extremely high catalytic efficiency of catalases, O_2 is generated at a rate of millions of molecules per second when concentrations of H_2O_2 are high. Under these conditions, catalytic singlet oxygen formation is highly probable. Another source of singlet oxygen is light. Porphyrins are excited by blue light and O_2 can absorb this energy to form singlet oxygen. Thus, O_2 at the active site could form singlet oxygen by photosensitization.

The selectivity of singlet oxygen for the site of attack in the porphyrin could be related to the exit pathway of dioxygen. Singlet oxygen could also diffuse to the active site through the channels used to evacuate catalytic O₂. This occurs when cells are under conditions in which singlet oxygen is produced and catalase is oxidized *in vivo* [20,21]. It also happens when purified CAT-1 is oxidized by an external source of singlet oxygen [19].

Under most physiological conditions, CAT-1e would be as efficient as CAT-1a. The differences in enzyme structure could only result in an increased turnover rate of the oxidized enzyme [20]. Because of its important role as antioxidant enzymes, and inasmuch as oxidation appears to be unavoidable, catalase could have been selected through evolution to remain active even when oxidized at its active site. In fact, preservation of functional and structural catalase properties in the oxidized form could be important for microbial survival.

Acknowledgments:

We thank Dr. Armando Gómez-Puyou for critically reviewing the manuscript.

Abbreviations:

CAT-1, *Neurospora crassa* catalase-1; HP11, *Escherichia coli* hydroperoxidase II; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; SDS, sodium dodecyl sulfate; PB, phosphate buffer

REFERENCES

1. Loewen, P.C.; Switala, J. Purification and characterization of spore-specific catalase-2 from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Cell Biol.* **66**:707–714; 1988.
2. Hengge-Aronis, R. Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* **72**:165–168; 1993.
3. Willekens, H.; Langebartels, C.; Tiré, C.; van Montagu, M.; Inzé, D.; van Camp, W. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**:10450–10454; 1994.
4. Engelmann, S.; Linder C.; and Hecker, M. Cloning, nucleotide sequence and regulation of *katE* encoding: a σ^B -dependent catalase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**:5598–5605; 1995.
5. Navarro, R. E.; Stringer, M. A.; Hansberg, W.; Timberlake, W. E.; Aguirre J. *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr. Genet.* **29**:352–359; 1996.
6. Kawasaki, L.; Wyson, D.; Diamond, R.; Aguirre, J. Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J. Bacteriol.* **179**:3284–3292; 1997.
7. Bagyan, I.; Casillas-Martínez, L.; and Setlow, P. The *katX* gene which encodes for the catalase in spore of *Bacillus subtilis*, is a forespore-specific gene controlled by σ^F , and *katX* is essential for hydrogen peroxide resistance of the germinating spore. *J. Bacteriol.* **180**:2057–2062; 1998.
8. Kawasaki, L.; Aguirre, J. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **183**:1434–1440; 2001.
9. Peraza, L.; Hansberg, W. *Neurospora crassa* catalases, singlet oxygen and cell differentiation. *Biol. Chem.* **383**:589–595; 2002.
10. Michán, S.; Lledías, F.; Baldwin, J. D.; Natvig, D. O.; Hansberg, W. Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. *Free Radic. Biol. Med.*

- 33**:521–532; 2002.
11. Johnson C. H.; Klotz, M. G.; York, J. L.; Kruft, V.; McEwen, J. E. Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases. *Microbiology* **148**:1129–1142; 2002.
 12. Michán, S.; Lledías, F.; Hansberg, W. Asexual development is increased in *Neurospora crassa* *cat-3* null mutant strains. *Eukaryot. Cell* **2**:798–808; 2003.
 13. Garciaa, M. X. U.; Alexandera, H.; Mahadeob, D.; Cotterb, D. A.; Alexandera, S. The *Dictyostelium discoideum* prespore-specific catalase B functions to control late development and to protect spore viability. *Biochim. Biophys. Acta* **1641**:55-64; 2004.
 14. Hansberg, W.; Aguirre J. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell insulation from dioxygen. *J. Theor. Biol.* **142**:201–221, 1990.
 15. Hansberg, W. A hyperoxidant state at the start of each developmental stage during *Neurospora crassa* conidiation. *Ciência e Cultura* **48**:68–74; 1996.
 16. Díaz, A.; Rangel, P.; Montes de Oca, Y.; Lledías, F.; Hansberg, W. Molecular and kinetic study of catalase–I, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Radic. Biol. Med.* **31**:1323–1333; 2001.
 17. Switala, J.; Loewen, P. C. (2002) Diversity of properties among catalases. *Arch. Biochem. Biophys.* **401**:145–154.
 18. Lardinois, O. M.; Mestdagh, M. M.; Rouxhet, P. G. Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* **1295**:222–238; 1996.
 19. Lledías, F.; Rangel, P.; Hansberg, W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* **273**:10630–10637; 1998.
 20. Lledías, F.; Rangel, P.; Hansberg, W. Singlet oxygen is part of a hyperoxidant state generated during spore germination. *Free Radic. Biol. Med.* **26**:1396–1404; 1999.

21. Lledías, F.; Hansberg, W. Catalase modification as a marker for singlet oxygen. *Methods Enzymol.* **319**:110–119; 2000.
22. Lledías, F.; Hansberg, W. Oxidation of human catalase by singlet oxygen in myeloid leukemia cells. *Photochem. Photobiol.* **70**:887–892; 1999.
23. Bravo, J.; Fita, I.; Gouet, P.; Jouve, H. M.; Melik-Adamyán, W.; Murshudov, G. N. Structure of catalases. In: Scandalios, J. G., ed. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997:407–445.
24. Loewen, P. C.; Switala, J.; von Ossowski, I.; Hillar, A.; Christie, A.; Tattrie, B.; Nicholls, P. Catalase HPII of *Escherichia coli* catalyzes the conversion of protoheme to *cis*-heme *d*. *Biochemistry* **32**:10159–10264; 1993.
25. Pace, N. C.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G.; Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science* **4**:2411–2423; 1995.
26. Reyes-Vivas, H.; Martínez-Martínez, E.; Mendoza-Hernández, G.; López-Velázquez, G.; Pérez-Monfort, R.; Tuena de Gómez-Puyou; M., and Gómez-Puyou, A. Susceptibility to proteolysis of triosephosphate isomerase from two pathogenic parasites: characterization of an enzyme with an intact and a nicked monomer. *Proteins* **48**:580-590; 2002.
27. Rørth, M.; Jensen, P. K. Determination of catalase activity by means of the Clark oxygen electrode. *Biochim. Biophys. Acta* **139**:171–173; 1976.
28. Margoliash, E.; Novogrodsky, A.; Schejter, A. Irreversible reaction of 3-Amino-1,2,4-triazole and related inhibitors with the protein catalase. *Biochem. J.* **74**:339–348; 1960.
29. Ogura, Y.; Yamazaki, I. Steady-state kinetics of the catalase reaction in the presence of cyanide. *J. Biochem.* **94**:403–308; 1983.
30. Levine, A.; Tenhaken, R.; Dixon, R.; Lamb, C. H₂O₂ from oxidative burst

orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**:583–593; 1994.

31. Noventa-Jordão, M. A.; Couto, R. M.; Goldman, M. H. S.; *et al.*, Catalase activity is necessary for heat-shock recovery in *Aspergillus nidulans* germlings. *Microbiology* **145**:3229–3234; 1999.
32. Bravo, J.; Mate, M. J.; Schneider, T.; Switala, J.; Wilson, K.; Loewen, P. C.; Fita, I. Structure of catalase HPII from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution. *Proteins* **34**:155–166; 1999.
33. Maj, M.; Nicholls, P.; Obinger, C.; Hillar, A.; Loewen, P. C. Reaction of *E. coli* catalase HPII with cyanide as ligand and inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta* **1298**:241–249; 1996.
34. Jacob, G. S.; Orme-Johnson, W. H. Catalase of *Neurospora crassa*. 1. Induction, purification, and physical properties. *Biochemistry* **18**:2967–2975; 1979.
35. Kikuchi, K.; Kawamura-Konishi, Y.; Suzuki, H. The reaction of *Aspergillus niger* catalase with methyl hydroperoxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**:88–94; 1992.

† Díaz, A.; Horjales, E.; Rudiño-Piñera, E.; Arreola, R.; Hansberg, W. Unusual Cys-Tyr covalent bond in a large catalase. Manuscript in preparation.

page 4, 5 and 19

Table 1. Kinetic constants of CAT-1a and CAT-1e

| | CAT-1a | CAT-1e |
|--|--|--|
| $S_{0.5(1)}$ (M) | 0.021 ± 0.002 | 0.051 ± 0.006 |
| $V_{\max(1)}$ (U/mg) | $2.04 \times 10^6 \pm 6.4 \times 10^4$ | $2.15 \times 10^6 \pm 1.1 \times 10^5$ |
| $S_{0.5(2)}$ (M) | 0.57 ± 0.023 | 0.81 ± 0.054 |
| $V_{\max(2)}$ (U/mg) | $3.4 \times 10^6 \pm 6.7 \times 10^4$ | $3.26 \times 10^6 \pm 1.1 \times 10^5$ |
| $k_{\text{cat}(1)}$ (s^{-1}) | 1.12×10^7 | 1.18×10^7 |
| $k_{\text{cat}(1)}/S_{0.5(1)}$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) | 5.32×10^8 | 2.31×10^8 |
| $k_{\text{cat}(2)}$ (s^{-1}) | 1.86×10^7 | 1.78×10^7 |
| $k_{\text{cat}(2)}/S_{0.5(2)}$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) | 3.26×10^7 | 2.20×10^7 |

Figure Legends

Figure 1. Differences in enzyme stability at high temperatures and in the presence of molar concentrations of guanidine-HCl. (A) CAT-1a and CAT-1e conformers were incubated at different temperatures and then analyzed by native PAGE. (B) CAT-1a and CAT-1e conformers were incubated 48 h at different guanidine-HCl concentrations and then analyzed by native PAGE. **d** indicates dimer, **m** indicates monomer.

Figure 2. Differences in enzyme stability in the presence of subtilisin. CAT-1a (■ and solid lines) and CAT-1e (○ and dashed lines) conformers were incubated with subtilisin for different times and the remaining activity measured (A). The same samples were analyzed by native PAGE (B). Upper panel: Coomassie blue staining, lower panel: zymogram. Dashed lines and d_{63} indicate the dimer made by 63 kDa polypeptides; (C) Densitometry of the Coomassie blue stained 63 kDa band. Results are the mean \pm SEM of three separate determinations.

Figure 3. Differences in the pH dependence of enzyme activity and stability. A) Specific activity of CAT-1a (clear bars) and CAT-1e (striped bars) assayed at the indicated pH values. B) Stability of CAT-1a (■ and solid lines) and CAT-1e (○ and dashed line) at the acidic range of pH. Enzyme activity at pH 7.8 was taken as 100%. Data are the mean \pm SEM of three separate determinations.

Figure 4. Differences in heme fluorescence of CAT-1 conformers. Purified CAT-1 at a concentration of 5 mg/ml was excited at 400 nm and fluorescence emission was detected between 420 and 700 nm. Fluorescence was measured immediately after purification (lower black line) and again after one (intermediate gray line) and after eight-week (upper light gray line) storage of the same sample. After one week, CAT-

1 was partially oxidized and there was an increment of fluorescence at the region from 560 nm to 700. After eight weeks, it was fully oxidized and there was a further increase between 480 and 520 nm.

Figure 5. Differences in enzyme sensitivity to cyanide inhibition. KCN inhibited CAT-1 competitively with a K_i of 0.76 μM in the case of CAT-1a conformer (■ and solid line) and of 0.28 μM in the case of CAT-1e (○ and dashed line). Data are the mean \pm SEM of three separate determinations.

Figure 6. Differences in enzyme saturation kinetics. A) Kinetics of CAT-1a; B) Kinetics of CAT-1e. Data are the mean \pm SEM of three separate determinations. Solid lines: fits of the data to the two-components Hill equation with Hill numbers of 1.2 and 1.7. Dashed lines: theoretical curves for each component. Shown below each graph are the residuals from the fit of the data to the three equations considered: solid lines, two-component equation with Hill numbers of 1.2 and 1.7 for the first and second component, respectively; dot lines, two-component equation without cooperativity; dash dot lines: single Michaelis-Menten equation.

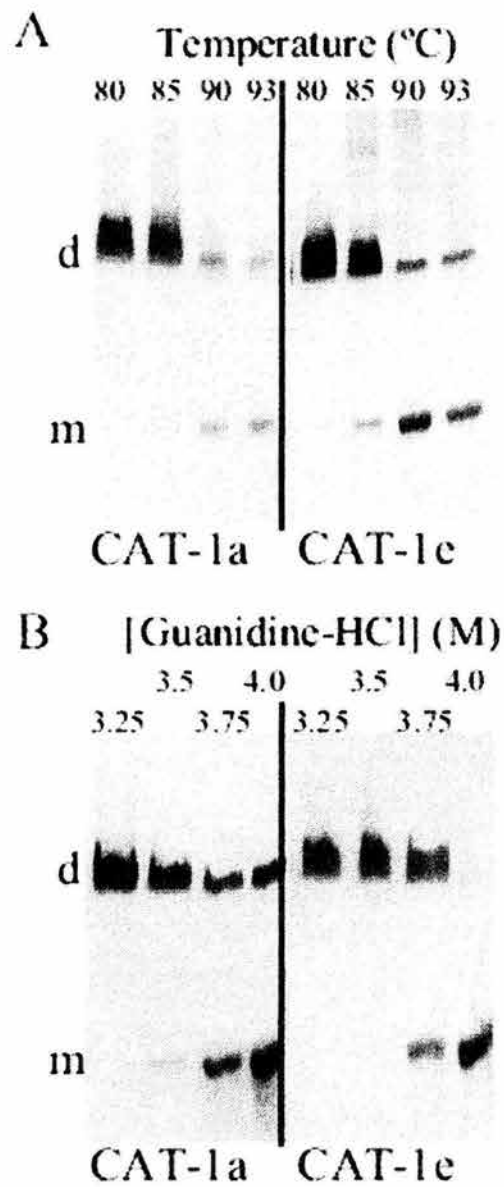


Fig. 1

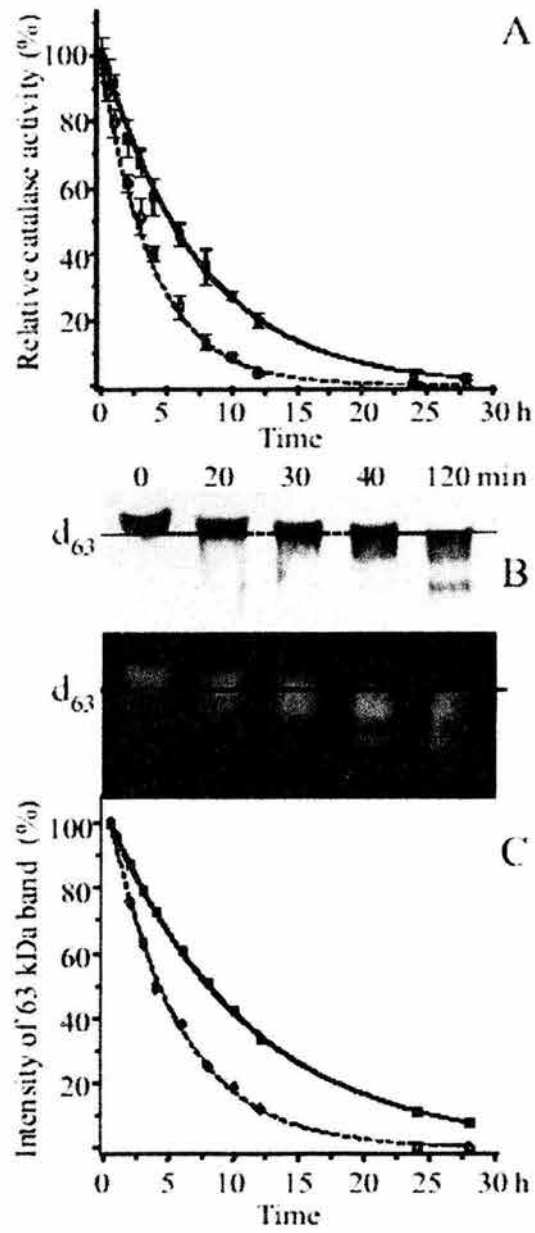


Fig. 2

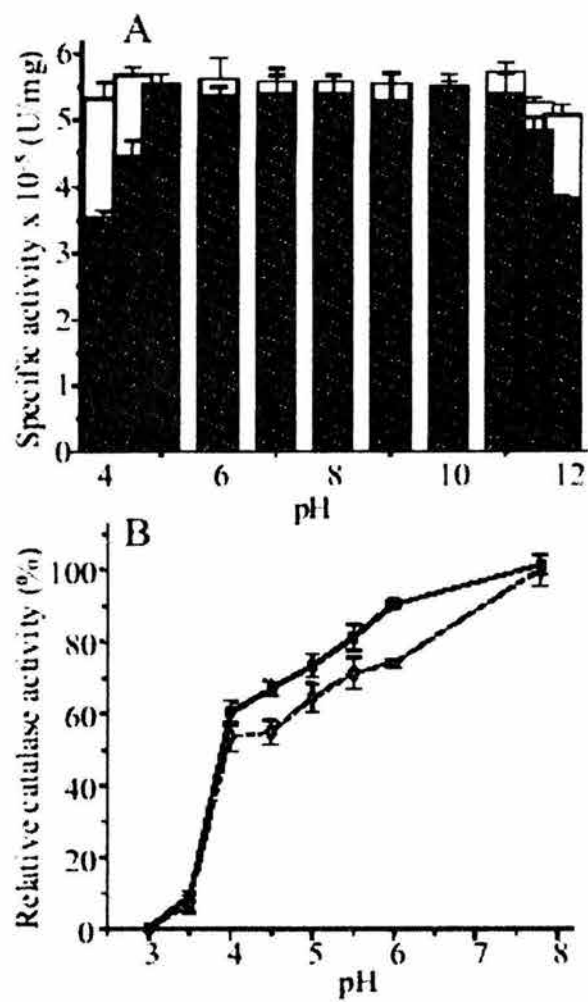


Fig. 3

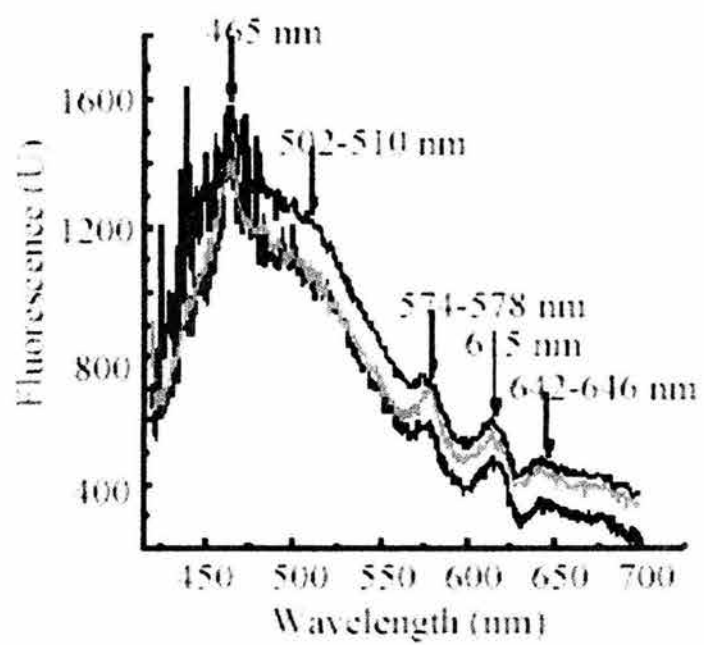


Fig. 4

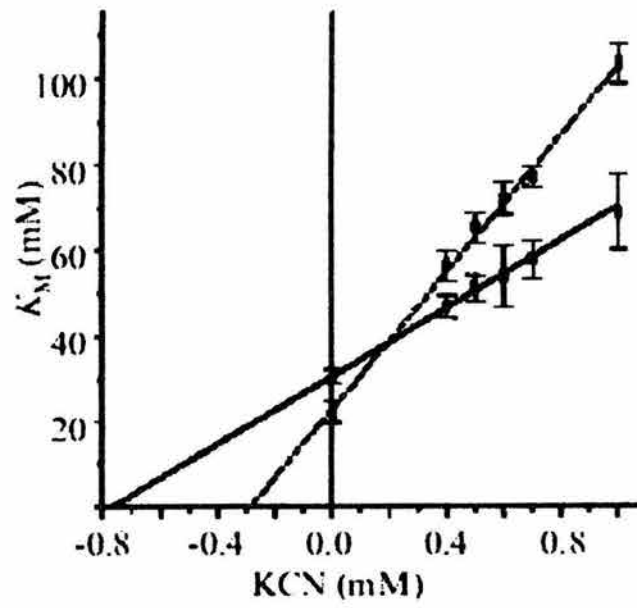


Fig. 5

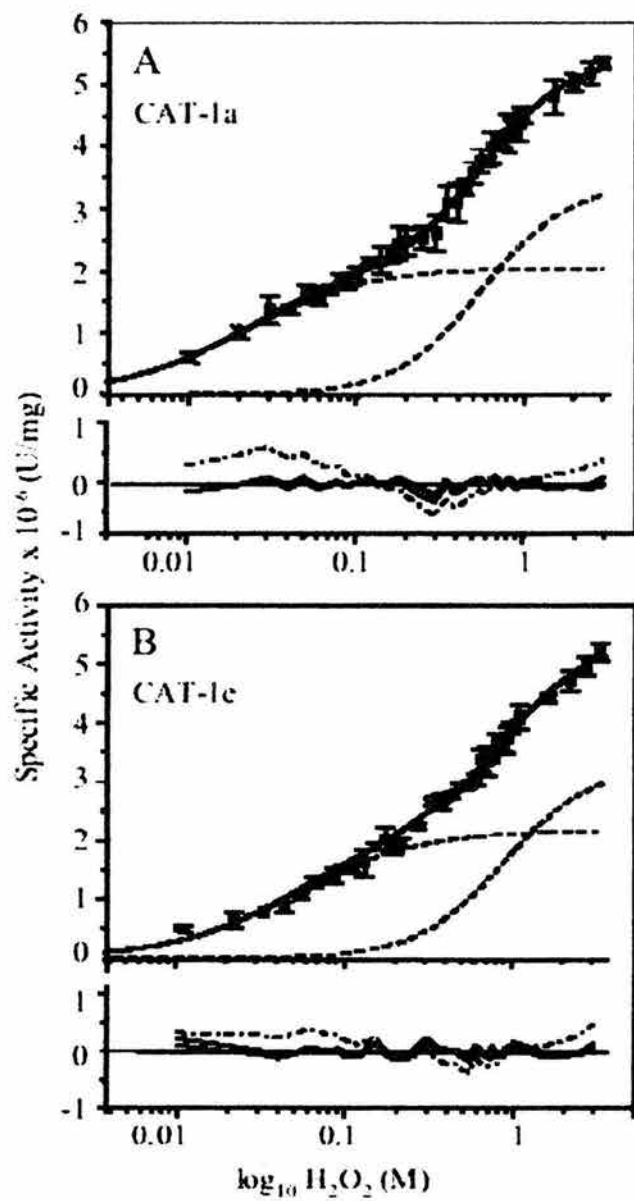


Fig. 6

JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY

ASSOCIATE EDITOR: DR. DOUGLAS C. REES

Division of Chemistry and Chemical Engineering, 114-96
California Institute of Technology, Pasadena, CA 91125 USA

Telephone: 626 395 8393 FAX: 626 744-9524 E-MAIL: dcrees@caltech.edu

May 19, 2004

Prof. Wilhelm Hansberg
Departamento de Bioquímica
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México
04510 México, D.F.
México

e-mail: whansberg@ifc.unam.mx

Dear Prof. Hansberg,

Thank you for submitting your manuscript entitled "Unusual Cys-Tyr covalent bond in a large catalase" (manuscript number PEW270/04) to the *Journal of Molecular Biology*. The manuscript has been reviewed by two knowledgeable reviewers whose reports are attached. While both reviewers acknowledge the significance of this work, they also note that the manuscript requires modification, and I would be happy to receive a revised and shortened manuscript that addresses the points they raise.

When returning your revised manuscript (two copies or a pdf file), please indicate in an accompanying letter how you have responded to the reviewer's suggestions. In the process of revision, would you please check that the manuscript adheres to the format described on the Preparation of Manuscripts / Preparation of Figures instruction sheets posted at <http://www.elsevier.com/locate/jmb>? If more than 60 days elapse before we receive your revised manuscript, it may be treated as a new submission and given a new receipt date.

Yours sincerely,

Douglas C. Rees

Research article

Unusual Cys-Tyr covalent bond in a large catalase

ADELAIDA DÍAZ¹, EDUARDO HORJALES², ENRIQUE RUDIÑO-PIÑERA²,
RODRIGO ARREOLA², AND WILHELM HANSBERG^{1*}

*¹Instituto de Fisiología Celular and ²Instituto de Biotecnología, Universidad
Nacional Autónoma de México, México*

Running title: Cys-Tyr covalent bond in a large catalase

* Corresponding author
Prof. Wilhelm Hansberg
Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70-242; 04510 México, D. F. MEXICO
Phone: (5255) 5622 5655; FAX: (5255) 5622 5630
E-mail: whansberg@ifc.unam.mx

Summary

Catalase-1, one of four catalase activities of *Neurospora crassa*, is associated with non-growing cells and accumulates in asexual spores. It is a large, tetrameric, highly efficient, and durable enzyme that is active even at molar concentrations of hydrogen peroxide. Catalase-1 is oxidized at the heme by singlet oxygen without significant effects on enzyme activity. Here we present the crystal structure of catalase-1 at 1.75 Å resolution. Compared to structures of other catalases of the large class, main differences were found at the carboxy-terminal domain. Heme group is rotated 180° around the α - γ -meso carbon axis with respect to clade III small catalases. There is no co-ordination bond of the ferric iron at the heme distal side in catalase-1. Catalase-1 structure exhibited partial oxidation of heme *b* to heme *d*. Singlet oxygen, produced catalytically or by photosensitization, may hydroxylate C5 and C6 of pyrrole ring III with a subsequent formation of a γ -spirolactone in C6. Singlet oxygen production at the active site explains photo-inactivation in small catalases and other modifications in catalases and heme proteins. The modification site in catalases depends on the way dioxygen exits the protein: mainly through the central channel or the main channel in large and small catalases, respectively. Catalase-1 structure revealed an unusual covalent bond between cysteine sulfur and the essential tyrosine of the proximal side of the active site. A peptide with the predicted theoretical mass of the two bound tryptic peptides was detected by mass spectrometry. A mechanism for the Cys-Tyr covalent bond formation is proposed. The tyrosine bound to the cysteine would be less prone to donate electrons to compound I to form compound II, explaining catalase-1 resistance to substrate inhibition and inactivation. An apparent constriction of the main channel at Ser198 lead us to propose a gate that opens the narrow part of the channel when there is sufficient hydrogen peroxide in the small

cavity before the gate. This mechanism would explain the increase in catalytic velocity as the hydrogen peroxide concentrations rises.

Keywords: crystal structure, heme oxidation, singlet oxygen, *Neurospora crassa*

Introduction

Catalases are ubiquitous enzymes present in archea, eubacteria, fungi, plants, and animals. Besides monophyletic monofunctional catalases,^{1,2} other enzymes, such as catalase-peroxidases, Mn-catalases, peroxidases, and peroxiredoxins, contribute to hydrogen peroxide (H₂O₂) disposal. H₂O₂ is inevitably formed in cells: most of it comes from superoxide (O₂⁻) dismutation and from the activity of some oxidases. O₂⁻ arises mainly by electron leakage from respiratory chain and from activity of few enzymes, mainly NADPH oxidases and xanthine oxidase. O₂⁻ is dismutated to H₂O₂ by superoxide dismutase. H₂O₂ do not react with nucleic acids, most proteins, or lipids. However, removal of H₂O₂ is vital to the cell because it gives rise to the more reactive oxygen species, singlet oxygen and hydroxyl radical.³ Singlet oxygen and hydroxyl radical react close to the site they are formed and they do so with most cellular compounds. H₂O₂ disposing enzymes have a K_M for H₂O₂ that differs 4 orders of magnitude: monofunctional catalases having the highest K_M values (>200 mM);^{4,5} peroxiredoxins the lowest (<0.02 mM).⁶ Differences in K_M indicate that organisms affront large differences in H₂O₂ concentration to which they respond with a battery of different enzymes.

The *Neurospora crassa* genome, sequenced by the Whitehead Institute/MIT,⁷ shows three monofunctional catalases, a catalase-peroxidase, besides three peroxiredoxins and several peroxidases. We have studied the two large monofunctional-catalases, CAT-1 and CAT-3, and the catalase-peroxidase, CAT-2. CAT-1 and CAT-3 are homotetrameric large enzymes (>80 kDa subunits)^{4,8} belonging to clade II, which only includes catalases from bacteria and fungi.^{1,2} Most conspicuous difference between small and large catalases is the presence in large catalases of an extra carboxy-terminal domain, of about 150 residues, that has a "flavodoxin-like" topology.^{9,10}

CAT-1 is associated with non-growing cells and is accumulated particularly in asexual spores (conidia).^{8,11} CAT-3 is associated with growing cells and is induced under different stress conditions.⁸ CAT-2 is a typical catalase-peroxidase, probably of bacterial origin,^{12,13} with catalase and peroxidase activities and is present in cells undergoing autolysis (Peraza & Hansberg, unpublished).

The three enzymes studied are related to cell differentiation: CAT-1 is highly accumulated in conidia^{4,8,11} and is important for germination, as was shown for the homologous *Aspergillus nidulans* CatA;^{14,15} CAT-2 is induced during aerial hyphae and conidia formation;¹² and CAT-3 is important to cope with different stress conditions and is related with the start of conidiation.⁸ A *cat-3* null mutant strain is prone to develop oxidative stress and increases conidiation, forming six times more aerial hyphae and conidia than wild type.¹⁶ These data are in accordance with the hypothesis that cell differentiation in *N. crassa* occurs as a response to oxidative stress.^{11,17}

All catalases tested so far are oxidized giving rise to active conformers with increased electrophoretic mobility. An oxidation site was traced to the heme group. Enzyme oxidation occurs spontaneously in purified catalases under storage, but can be induced rapidly and specifically by singlet oxygen.¹⁸ Catalase oxidation occurs *in vivo* under oxidative stress conditions, particularly when singlet oxygen is produced.^{19,20}

Catalases share a highly conserved core structure but have nevertheless great functional differences,^{10,21,22} particularly between large and small catalases.^{5,23} Catalases in general, but particularly large catalases, resist denaturing conditions such as organic solvents, high concentration of denaturants, detergents or salt.^{4,24} Small catalases are inhibited and inactivated by substrate while some large catalases are resistant to molar concentrations of H₂O₂.^{4,5,23} To address these functional differences between catalases, the structure of CAT-1 is compared to

large catalases, HPII^{25,26} and *Penicillium vitale* (PVC)^{27,28}, and to the structures of small catalases from *Saccharomyces cerevisiae* Catalase-A (SCC-A),^{29,30} human erythrocyte (HEC),³¹⁻³³ bovine liver (BLC),^{9,34,35} *Proteus mirabilis* (PMC),³⁶ *Micrococcus lysodeikticus* (MLC)^{37,38} and *Pseudomonas syringae* CatF (PSC).³⁹

Results and Discussion

Structure determination and quality

Large but relative thin hexagonal crystals (0.36 x 0.2 x 0.02 mm) were diffracted at the Stanford Synchrotron Radiation Laboratory, beam line 9.1. CAT-1 crystal structure was determined in the C2 space group. Crystal packing and self-rotation results support space group C2. The non-crystallographic symmetry in C2 is perpendicular to axis b and has a 6° deviation with respect to axis c. Non-crystallographic symmetry formed a tetramer with a strict 222 symmetry. The asymmetric unit was a dimer and cell dimensions were $a = 130 \text{ \AA}$, $b = 182.24 \text{ \AA}$ and $c = 90.36 \text{ \AA}$ and $\beta = 133.41^\circ$. A data set was obtained with a 1.75 Å resolution (Table 1). The final model has an R and R_{free} values of 18.3 and 20.6% in the resolution shell between 1.75 and 15.0 Å.

From a Ramachandran plot, we obtained 99.7% of amino acids in the most favored regions; only Val238 and His720 of each monomer were in a disallowed region (see below).

Structure of CAT-1

Like all catalases, CAT-1 tetramer has a 222 molecular symmetry. The three molecular two-fold axes P, Q, R are used here, as described for BLC.³⁵ The R axis coincides with the CAT-1 b crystal axis.

Structural regions of the monomer are very similar to those described for other catalases:^{10,21,34} a long amino-terminal arm, an antiparallel eight-stranded β -barrel, a wrapping loop, a four α -helical domain and, in large catalases, a

C-terminal domain with "flavodoxin-like" topology⁹ joined by a long loop (Fig. 1 and 2a).

The sequence of the amino end of CAT-1, determined by Edman degradation, indicated processing of the first twenty-one amino acids, although no signal peptide for processing was evident. The mature enzyme starts at Ser22. However, another 17 amino acids were not detected in the density and thus Ala39 is the first amino acid in the crystal structure. In the undetected loose end, most amino acids are charged (5 negative and 5 positive charges). Modifications at the amino end could be related to the detected changes in electrophoretic mobility.¹⁸

The amino-terminal arm starts with two loops, the second one containing two short β -strands (-1 and -2 in Fig. 1) that are not present in all catalases and only the first one is present in HP11.²⁶ After a three turn conserved helix (α 2) a straight coil leads to the active site. It is followed by a turn that contains the essential catalytic His92 of the distal side of the active site. The amino-terminal arm (Ser22 to Val91) is 70 amino acids long. It participates in the formation of a reciprocal hook between subunits by entering into a loop of the wrapping domain of the Q related subunit (Fig. 2b).¹⁰ It also interacts with the R related subunit partially covering each other's heme pocket (Fig. 2c).

The eight antiparallel β -strands conform a sheet that is part of the heme pocket (263 amino acids, His92 to Ala354) (Fig. 1 and 2a). Three α -helices (α 3 - α 5) separate the first four from the following four consecutive β -strands. β 2 strand ends at the essential Ser131 and β 4 strand at the essential Asn165, both are residues of the distal side of the active site. Because the first part of β 5 interacts solely with β 4 and the second part with strand β 6 only, β 5 strand has three amino acids that do not participate in the β -sheet. The first one, Val238, has distorted main chain angles. In other catalases, the residue in this position always is in an

unfavorable position¹⁰. Strands $\beta 6$ and $\beta 7$ are separated by two α -helices ($\alpha 6$ and $\alpha 7$). After a short helix ($\alpha 7'$) following $\beta 7$ strand, a long loop leads to $\beta 8$, which at its start is almost perpendicular to $\beta 6$ strand. Next to $\beta 8$, a short Π -helix ($\alpha 8$) seems to be present in all catalase structures but has been recognized as such only in PVC²⁸ and BLC.³⁵ A long straight coil running almost parallel to the P axis closes the heme cavity and ends at Cys356. Cys356 forms a covalent bond with the essential tyrosine of the proximal side, thus closing the heme pocket with a clip (see below).

The wrapping loop (Fig. 1 and Fig 2a) has 110 amino acids (Phe355 to His464). In the first coil, there is a short β -strand ($\beta 8'$). It is continued with an antiparallel long helix ($\alpha 9$) containing the essential Tyr379. After an adjacent one-turn helix ($\alpha 9'$), a long coil of low sequence homology and secondary structure makes contact with the amino-terminal end of the Q related subunit (Fig. 1b). At the middle of the coil, there is *cis*-Pro425, which is also present in HP11²⁶ and PVC (Melik-Adamyan *et al.*, unpublished results). This Pro and other prolines (Pro395, Pro399, Pro402, Pro433) of the wrapping loop are conserved in most catalases and are probably important for the interaction between subunits. The long coil ends with a one-turn helix ($\alpha 9''$) close to the α -helical domain.

The α -helical domain contains 59 amino acids (Phe465 to Gly523) forming four antiparallel contiguous α -helices ($\alpha 10$ - $\alpha 13$) (Fig. 1 and 2a). $\alpha 10$ and $\alpha 12$ build the site for NADPH binding in clade III small catalases. The four helices are in close contact with $\alpha 3$ - $\alpha 5$ forming a cluster of seven antiparallel helices. The hydrophilic mobile coil (B value $>26 \text{ \AA}^2$) that joins the carboxy-terminal domain sterically prevents NADPH binding in large catalases. Like in PVC, this loop in CAT-1 is 31 amino acids long (Glu524 to Lys554), 6 amino acids less than HP11.

Its one turn helix ($\alpha 14$ in Fig.1) starts where the larger equivalent helix in HPII ends.

The carboxy-terminal domain is highly structured presenting an α/β arrangement with mainly parallel β -strands (Fig. 1 and 2a) and hydrophobic regions alternating hydrophilic and mobile loops (B values $>25 \text{ \AA}^2$). In CAT-1 this domain has 182 amino acids (Ser555 to Tyr736). The first half of the carboxy-terminal domain starts with two parallel β -sheets ($\beta 9$ and $\beta 10$) joined by a long helix ($\alpha 15$) and followed by a loop containing two antiparallel short β -strands ($\beta 11$ - $\beta 12$). It ends with a long loop that has a small β -strand ($\beta 13$) and a one-turn helix ($\alpha 15'$). The second half of the domain starts with two parallel β strands ($\beta 14$ and $\beta 15$) joined by a long and broken helix ($\alpha 16$ and $\alpha 16'$), followed by $\alpha 17$ and two antiparallel β sheets ($\beta 16$ and $\beta 17$). It ends in a long loop containing $\alpha 18$ and two small helices ($\alpha 19$ and $\alpha 19'$).

His720 at the end of $\alpha 18$ is the second amino acid that is in a non-allowed region of the Ramachandran plot. The histidine is conserved in many enzymes and is invariably followed by an arginine or lysine. The imidazole of His720 forms a hydrogen bond with Arg556 and with the carbonyl group of Ser265 and with two water molecules. A similar situation is observed in HPII.²⁶ These other two amino acids are conserved in all CAT-1 sequenced homologues. Because this is a region just before the entrance to the major channel, it could have the function of routing H_2O_2 molecules to the channel.

Comparison of CAT-1 with the HPII and PVC

Main chain structural alignment of CAT-1, HPII and PVC showed extensive structural conservation (Fig. 3). Major differences are at the N-terminus and at the

carboxy-terminal domain. HP11 has a considerably longer N-terminus than both CAT-1 and PVC (Fig. 3a). In CAT-1 the second loop of the N-terminus is longer and has a second β -strand that is not present in the other two catalases (L1 in Fig. 3a).

The carboxy-terminal domain of large catalases has low sequence similarity but conserved general structure (Fig 3b). There are however important structural differences in this domain: CAT-1 has 28 and 24 amino acids more than in HP11 and PVC, respectively, due to two "insertions" of 11 and 14 amino acids. The first one contains a β -strand that is antiparallel to β 17 (β 16 in Fig. 3b) and the second one is in place of the first turn of α 18 in HP11 and PVC (L2 in Fig. 3b). At the start of α 15, PVC has one turn more; it lacks β 11 and β 12 stands, and contains an "insertion" of 16 amino acids in the middle of α 16 (LL in Fig. 3b, main chain appears broken in the PDB). In PVC the very C-terminal end is six amino acids shorter and has a different orientation than in CAT-1 and HP11 (Fig. 3b).

Cavities and glycosylation sites

The central cavity of the tetramer is at the origin of the PQR molecular symmetry axes (Fig. 2c). The central channel of the four subunits leads to this large spherical cavity filled with water molecules (see below). It is the biggest cavity of the tetrameric structure having a diameter of 6.9 Å. To both sides of the central cavity along the P axes in the dimer, a pair of cavities is formed between the α -2 helix of one subunit and the α -9 helix of the Q related subunit. These cavities are about half the diameter of the central one. Unjustified electron density visible at σ 3.0 in a 2fo-fc map in these cavities suggests bonding of unidentified substances.

Of the four possible glycosylation sites in CAT-1 no one showed indication of bound N-acetylglucosamine, although CAT-1 is glycosylated with α -glucose and/or α -mannose.⁴ Glycosylation could be at the loose undetected N-terminal end.

The active site

The heme is buried. It lays in-between the β -barrel (β 2- β 5), α 3, and α 9. The distance between the iron and the molecular center is 23 Å and between the iron and the molecular surface about 20 Å. The heme has the propionic acid chains oriented towards the center of the oligomeric structure (Fig. 2a). Propionic acids make salt bridges with three conserved arginines (Arg89 in α 2, Arg129 in β 2 and Arg386 in α 9) (Fig. 4a). Like in HP11 and PVC, the heme is rotated 180° around the α - γ -meso carbon axis with respect to small clade III catalases.¹⁰ The vinyl group of pyrrole ring I interacts with Asn239 (β 5), which in most catalases is a His, and the methyl group of the ring interacts with the catalytic Asn165 (β 4) of the distal side of the active site. The pyrrole groups of ring II seem to interact with no amino acid or water molecule. The methyl group of pyrrole ring IV interacts with Gly164 (β 4).

In the distal side of the active site, the catalytic His92 lays with its imidazole ring almost parallel to pyrrole ring IV (Fig. 4a, 7a), at a mean distance of 3.6 Å. At the opposite side, the phenyl group of the conserved Phe178 (α 3) also lays parallel to pyrrole ring II (Fig. 4a, 7a), at a mean distance of 3.6 Å. The hydrophobic character of this side of the active site is accentuated by Val91 and Phe170 and the conserved Phe81 from the amino-terminal arm of the R related subunit. Val91 is close but does not interact with pyrrole ring III and the meso carbon- γ . Phe170 is close to pyrrole ring I but does not interact with it. The N δ of His92 forms a

hydrogen bond with the essential Ser131 hydroxyl ($\beta 2$); N ϵ forms a hydrogen bond with a water molecule (W1). W1 also forms a hydrogen bond with the catalytic Asn165. This water molecule is the closest one to the iron. It is located at a mean distance of 4.64 Å from it, indicating that there is no co-ordination of the iron at the distal side. The conformation of His92 is stabilized by Arg129, which forms a hydrogen bond with its main chain oxygen and with Thr132; both are totally conserved amino acids.

In the proximal side of the active site, the Fe(III) is 0.3 Å outside the plane of the porphyrin towards the deprotonated phenolic oxygen of Tyr379 ($\alpha 9$), which is at 2 Å from the iron (Fig. 4c). The phenolate forms hydrogen bonds with N ϵ and NH₂ of the conserved Arg375 ($\alpha 9$). The NH₁ of the Arg375 has a salt bridge to the O δ_1 of Asn239 ($\beta 5$) and to a water molecule. The C α -oxygen of Val163 ($\beta 4$) forms a hydrogen bond with the same water molecule and with the NH₂ of Arg375. This net of hydrogen bonds is conserved in all catalases with the only exception that CAT-1 has Asn239 instead of a histidine.

Three water molecules with low isotropic B values (13-15 Å²) are related to the heme or to amino acids of the active site (W1-WIII) (Fig. 4a): W1 interacts with the two propionic acids (or spirolactone, see below) at the proximal side; WII interacts with the propionic acid of ring IV at the distal side and the main chain carbonyl of Arg129 and Ser131 hydroxyl; and WIII is close to Asn165 and interacts with the main chain carbonyls of Val169 and Ile167. These water molecules are probably conserved in all catalases.³⁹

Heme oxidation related to singlet oxygen at the active site

Pyrrrole ring III is oxidized to a *cis*-hydroxyl group in C5 and a *cis*- γ -spirolactone in C6 (heme *d*) (Fig. 4a, b), like in HPII and PVC.^{10,40} The

refinement of the heme structure resulted in 57% occupancy of heme *b* and 43% of oxidized heme, heme *d*. Thus, the purified CAT-1 oxidized partially during the crystallization period. Although both heme groups are present in CAT-1, the conformation of the nearby Arg386 and Gln383 ($\alpha 9$) corresponds to the wild type HP11 containing heme *d* and not to the conformation that is observed in mutant enzymes containing heme *b*.⁴¹

Because the heme of CAT-1 is rapidly oxidized by singlet oxygen,^{18,19} we think that heme *d* is formed through a reaction involving singlet oxygen. Singlet oxygen would attack the double bond between C5 and C6 of ring III forming a transient endoperoxide. Upon breaking, the endoperoxide would generate *cis*-hydroxyl groups at these carbon sites. The hydroxyl group in C5 would then react with the carboxyl group of the propionic acid forming the γ -spirolactone and giving out a water molecule.

Singlet oxygen could be formed occasionally as a product of the enzyme activity. Because of the extremely high catalytic efficiency of catalases, catalytic singlet oxygen formation is probably inevitable. In the hydrophobic active site, the lifetime of singlet oxygen would be long enough to diffuse and react in its way out of the protein (see below). In the inactive HP11 mutant catalases^{10,41}, O₂ (singlet oxygen) is not formed and consequently the heme is not oxidized, indicating catalytic O₂ as the source of heme oxidation.

Light is another source for singlet oxygen production. Porphyrins are excited by blue light and O₂ can absorb this energy to form singlet oxygen. Thus, O₂ at the active site could form singlet oxygen by photosensitization. Moreover, many small catalases from plant, animals and bacteria are photo-inactivated, in contrast to CAT-1 which is highly resistant to photoinactivation.¹⁸ A probable reason for photo-inactivation of small catalases is singlet oxygen attack at the double bond of

the β -bridge between ring II and III. In fact, the heme structure in PMC and BLC is partially broken at the bridge between ring II and III.^{34,35,42,43}

The double bond of the vinyl group of the heme is another possible site for singlet oxygen attack with formation of a vinyl-peroxide. In catalases, vinyl groups of the heme are probable not accessible to O₂. However, in the crystal structure of *Burkholderia pseudomallei* catalase-peroxidase, the peroxide bound to a vinyl group of the heme⁴⁴ could be originated by singlet oxygen reaction at the vinyl double bond.

Amino acid residues vicinal to the heme are other oxidation sites for singlet oxygen. Singlet oxygen reacts preferentially with Trp, Tyr, His, Met, and Cys. The reported adduct in *B. pseudomallei* catalase-peroxidase between Met, Tyr, and Trp might result from a mechanism involving singlet oxygen. Singlet oxygen reacts with methionine to form methionine sulfone and the methionine sulfone found in the PMC³⁶ could originate by reaction with singlet oxygen. In CAT-1 and most catalases there is a valine instead of the oxidized methionine in PMC, which is adjacent to the essential His and accessible to catalytic O₂.

Tyr-Cys covalent bond, a resistance mechanism to H₂O₂ inactivation?

Cys356 sulfur is 1.9 Å from the C β of the functional Tyr379. The distance, electron density, and tetrahedral geometry of the bonds indicated the presence of a covalent bond between these residues (Fig. 4c). A similar covalent bond was described in HP11, although it involved a histidine instead of cysteine.⁴⁵

To confirm this covalent bond in CAT-1, a highly purified enzyme was subjected to trypsin hydrolysis and the resulting peptides were analyzed by mass spectrometry. The predicted theoretical mass for the bound tryptic peptides is 5,154.4, corresponding to the peptide carrying the Tyr379 (342-375) (MM =

3,778.8) and the one having the Cys356 (376-386) (MM = 1,377.6). A peptide with a molecular mass of 5,154 was detected by mass spectrometry (Fig. 5), proving the existence of the Cys-Tyr covalent bond. Other catalase peptides could be also identified in the MS analysis.

A possible mechanism for generation of this covalent bond is shown in Fig. 6. Because formation of the covalent bond in HP11 requires enzyme activity, compound I is presumed to be involved in its mechanism.⁴⁵ The proximal Tyr379 gives an electron to compound I to form compound II and a tyrosine cationic radical. The radical is stabilized in the ring migrating between atoms C2, C4, and C6. Upon deprotonation of the vicinal Cys356 thiol, the tyrosine radical in C6 is reduced by the thiol. The thiyl radical formed induces deprotonation of the tyrosine β -carbon and formation of the covalent bond. The anionic radical generated migrates to the Fe-porphyrin to form a compound II. Compound II reacts with H_2O_2 to form compound III and compound III liberates superoxide to return to the ferric state.²³ Two electrons arising from bond formation are eliminated as superoxide.

The Tyr379 covalently bonded to the Cys356 would be less prone to donate electrons to compound I to form compound II.⁴⁶ This would make the enzyme resistant to inactivation by substrate. In fact, CAT-1 is not inactivated by molar concentrations of H_2O_2 .⁴ A slow rate of formation of compound II and a higher rate for decomposition of compound III was proposed to explain the absence of reversible inhibition and inactivation by substrate in *Aspergillus niger* catalase R.²³

Small catalases have a different way to partially contend with compound II formation, namely by the ministration of electrons from bound NADPH and electron tunneling to the heme.⁴⁷⁻⁴⁹ In CAT-1, HP11, PVC (clade II) and also in CatF (clade I), besides not binding NADPH, the critical Ser196 for electron tunneling is substituted by a hydrophobic amino acid. In the HEC, a mechanism for

charge relay is proposed to fine-tune electron density at the active site.³¹ CAT-1 and other large catalases have an asparagine in place of the His218 involved in the charge relay in HEC, making this relay improbable in large catalases.

Thus, large catalases by forming a tyrosine adduct and small catalases by obtaining electrons from bound NADPH can partially reduce the tendency of compound I to form compound II and III.

Activity regulation by controlling the H₂O₂ flux through the main channel

Three channels can be identified by trains of water molecules. The major channel is 31.3 Å long and goes from the protein surface, near the loop that connects the α -helical domain with the carboxy-terminal domain (see upon), to the active site. The major channel is thought to be the entrance of H₂O₂ to the active site. In fact, H₂O₂ has been detected in the major channel upon incubation of an inactive HP11 crystal with H₂O₂.⁵⁰

Because water molecules are numbered from the active site to the protein surface (Fig. 7a), we will describe the channel starting from the active site. The first water molecule (W1) is fixed by N ϵ 2 of His92 and N δ 2 of Asn165 and is surrounded by Phe170, Phe178 (α 3), and Val91, together determining the narrow entrance to the active site (Fig. 4a, 7a). The second water molecule (W2) in the channel is 3.86 Å away from W1 and interacts with C ϵ 1 of Phe170. From W2 to W3 there are 2.97 Å and this gap is surrounded by hydrophobic amino acids (Val146, Val133, Leu134, Phe171, Ile182) (Fig. 7a). W3 in the main channel is hydrogen bonded by O δ 1 of Asp145, which also forms a hydrogen bond with W4. There is a collateral 51 Å-long channel, the minor channel, which starts at W3 and goes along Val181 (α 11) and Phe203 (α 4) and leads to the molecular surface at Asp314, close to the NADPH binding site in small catalases. W3 and the first water molecule of

the minor channel are very mobile (B values $>43 \text{ \AA}^2$). The minor channel is interrupted in CAT-1 at Phe171 and Gln207 ($\alpha 4$), similar to other catalases.^{26,51} W4 of the main channel interacts with W5 and W6. The main chain oxygen of Arg144 forms hydrogen bonds with W6 and W7, bridging the 4.8 \AA gap between these water molecules. Opposite to Arg144 is Ser198 whose hydroxyl interacts with W6 and the main chain oxygen of Ala196 with W7. After this site, the channel broadens into a small cavity that hosts a small net of interacting water molecules W7-W17. Most of these water molecules are very mobile (B values $31\text{-}56 \text{ \AA}^2$). The nearest path to the outlet goes from W7 to W15 (Fig. 7a). These water molecules forms salt bridges with the amido-groups of Ser198 and Ala199 and the O ϵ 2 of Glu489 ($\alpha 11$) and W16. W16 interacts with W17. The last part of the channel is funnel-shaped and almost perpendicular to the narrow part (Fig. 7a). W17 forms a hydrogen bond with O ϵ 1 of Gln197, which also interacts with W18 bridging the 4.34 \AA gap between these water molecules. W18 also interacts with main chain oxygen of Ala199, the N δ 1 of His492 ($\alpha 11$) and with W19, which is already at the molecular surface and is associated with the R related subunit together with W20-21.

Because the hydroxyl of Ser198 points towards the channel, the distance between the carbonyl oxygen of Arg144 and the O γ of Ser198 is 4.76 \AA . Considering H_2O_2 to be 3.7 \AA width and a 2.3 \AA radius for each hydroxyl group, there is not enough space for a H_2O_2 molecule to pass the strait. All large catalases have a hydroxyl group of either Ser/Thr protruding towards the channel, which could act as a gate to the narrow part of the channel that leads to the active site. In fact, when the inactive HP11 H128N mutant catalase was incubated with hydrogen peroxide, H_2O_2 molecules were found only in the small cavity, before Ser234 (Ser198 in CAT-1), and at the active site.⁵⁰

In large catalases, the gate and small cavity is formed by Arg144, Glu489 (numbers of CAT-1), and a loop of four amino acids (Q, A, Q/A, S/T). In small catalases, the Arg144 equivalent is conserved but lacks the loop of four amino acids. Proline at the N-side and alanine and histidine at the C-side invariably flank these four amino acids in twenty-eight large catalases sequenced. Only in PVC crystal structure the sequence appears P, E, A, A, V, A, H, (Melik-Adamyanyan *et al.*, unpublished results). However, due to the difficulty to distinguish between Q and E, and T and V, a probable sequence in PVC is P, Q, A, A, T, A, H. Thus, the sequence P, Q, A/G, Q/A, S/T, A, H might be considered characteristic for the major channel in large catalases. In CAT-1, the proline of this sequence is *cis*-Pro; also in HPII²⁶ and PVC (Melik-Adamyanyan *et al.*, unpublished results). This proline is in close contact with the R related subunit.

In PMC, a gate has been described at the very entrance to the active site, formed by Met53 (V91), Val95 (V133), and Phe132 (Phe170), and a cavity before the gate, formed by V146 (G185), K161 (F203), M179 (M221)⁵² (CAT-1 amino acids in parenthesis), which could have a equivalent function in small catalases.

A gate to the active site could be part of a mechanism to avoid formation of compound I when H₂O₂ concentration is low, a condition in which compound I would have increased probabilities to form the inactive compound II. If the small cavity before the gate senses H₂O₂ concentration, it could regulate gate opening accordingly. A net of hydrogen bonds between water molecules and amino acid residues in the cavity would tend to close the gate; H₂O₂ in the cavity would change hydrogen bonding and trigger the opening of the gate. Cooperativity of H₂O₂ binding and preferential binding of H₂O₂ over H₂O and broadening of the channel by H₂O₂⁵³ can be of relevance for H₂O₂ sensing and opening of the gate. Such a device would explain the reported increase in catalytic velocity as the hydrogen peroxide concentration rises.^{5,23}

O₂ exits through the central channel in large catalases

The central channel goes from the distal side of the active site to the central cavity of the tetramer. It is 16.8 Å long and goes along the coil adjoining the $\alpha 2$ helix and almost parallel to the $\alpha 9$ helix and to the $\alpha 2$ helix of the R related subunit. It consists of six interrelated water molecules, three associated with one subunit and three with the R related subunit (Fig. 7b). The water molecule closest to the heme (W_I) is 9.5 Å from the ferric iron and interacts with the propionic acid (spirolactone) of pyrrole ring III, and with the hydroxyl of Thr382 and the main chain amide of Val90. W_{II} interacts with the main chain oxygen of Glu88 and with W_{III} . W_{III} interacts with the hydroxyl group of Ser385 and the main chain oxygen of Arg85 of the P related subunit, which also interacts with W_{IV} , bridging the gap between W_{III} and W_{IV} . W_V interacts only with W_{IV} and W_{VI} , and W_{VI} with other water molecules of the central cavity of the tetramer.

Amino acids of the $\alpha 2$ helix that line the channel, D, H, E, R, I, P, E, R (82-89 in CAT-1) followed by a hydrophobic amino acid, are strictly conserved in large catalases, while only isoleucine, proline and the second arginine is conserved in small catalases. Also, Thr382 in helix $\alpha 9$ is conserved in large catalases but not in small catalases. These differences could have a functional meaning.

Because of the high catalytic efficiency of CAT-1, under conditions of large H₂O₂ concentrations⁴ the huge amount of products (H₂O and O₂) generated need to be released from the active site and protein. This can be done partially through the major channel, but this channel might be too narrow to allow an efficient release of products. The central channel is mainly hydrophilic and could be a way out for dioxygen produced in the active site. It stands out that the channel starts at pyrrole ring III, the site of oxidation in large catalases. The selectivity of singlet oxygen for the site of attack in the porphyrin could be related to the path that dioxygen

takes to exit the protein. We propose that, in CAT-1 and other large catalases, O₂ (singlet O₂) exits mainly through the central channel.

Guided by hydrophobic amino acid residues from the active site to the channel (Val91, Phe81 of the R related subunit, and Val90), dioxygen would encounter Thr382 hydroxyl group that together with other hydrophilic amino acid residues would direct dioxygen through the central channel. The encounter with Thr382 could be related to the *cis*-orientation of the hydroxyl groups possibly formed by a reaction of singlet oxygen with pyrrole ring III.

Substitutions of amino acids that broaden the major channel in large catalases might allow dioxygen to exit mainly through this channel. In fact, all active mutant HP11 catalases that have a wider major channel have heme *b* instead of heme *d*,⁵⁴ indicating that O₂ (singlet oxygen) now exits preferentially through the major channel and not the central channel.

Different to CAT-1 and other large catalases, small catalases can only contend with a low concentration of H₂O₂ due to substrate inhibition and inactivation. Catalytic efficiency of small catalases⁵ is generally lower than in CAT-1⁴ and dioxygen outlet would not be as critical as in CAT-1. The site of oxidation of the heme in BLC and PMC and the methionine in PMC suggest a preferential exit of dioxygen through the major channel. In fact, a molecular dynamic analysis indicates that products leave the active site through the major channel in PMC, although ten times more water molecules did so than O₂.⁵² A second molecular dynamic analysis indicates that products can exit also through the lateral and central channel, besides the major channel of SCCA. However, in the Val111Ala mutant, the major channel is widened and the lateral channel is blocked and thus the main exit of products is through the main channel.⁵³ These results suggest that O₂ can exit the enzyme through different channels; although

main exit in large catalases could be through the central channel and in small catalases through the main channel.

What is the function of the lateral and minor channel?

The lateral channel goes from the region of the NADPH binding site in small catalases (α -helical domain) to the proximal side of the active site. It is a remarkable structural feature that this channel is not made by the interaction of two subunits like the other channels. It is a long channel of 35.45 Å comprising 12 water molecules (Fig. 7c). W_A is 14.13 Å from the ferric iron in a hydrophobic surrounding, close to the vinyl group of pyrrole ring I. It interacts with the hydroxyl of Thr240 (β_5), the O δ_2 of Asp369, and the N ζ of Lys254 (β_6), which also forms a hydrogen bond with W_B and W_C , bridging the gap of 3.35 Å between W_A and W_B and the gap of 4.06 Å between W_B and W_C . W_B also forms hydrogen bonds with the main chain oxygen of Asp319 and Lys322 and W_C interacts with the main chain carbonyls of Lys322, Val238 (β_5), and Pro168 and with W_D . W_D interacts with W_E and W_E with the main chain amide of Trp324, the O ϵ of Gln303 and with W_F . W_F forms hydrogen bond with W_G and this water molecule with the main chain carbonyl of Asn540 and the O ϵ of Glu326, which also forms a hydrogen bond with W_H . W_H interacts with the N δ of His256 (β_6) and N ϵ of Gln234 and with W_I . W_I forms hydrogen bonds with O ϵ of Glu326, the hydroxyl of Tyr333 (β_8) and W_J . W_J interacts with W_K and W_K with W_L .

The function of this channel remains uncertain. Because it leads to the proximal side of the active site, it is difficult to visualize how the substrate would reach the distal side of the heme or how the products would go from the distal site to the channel. However, the channel is conserved in all catalases and has to have a

function. Otherwise, it would have been closed during evolution. Molecular dynamics analysis indicates that water can exit the protein through this channel.⁵³

The minor channel is interrupted by Arg260 in HP11, a conserved amino acid in most catalases (Arg223 in CAT-1). When this amino acid is substituted by Ala, a 2.5 time increase in specific activity is observed and the mutant enzyme turns more susceptible for inhibition by azide and DTT.⁵¹ This effect could be due to greater accessibility for substrate and inhibitors and also to an easier withdraw of reaction products. In CAT-1, the minor channel connects the major channel at the middle of its narrow lower part. The minor channel could function as a drain of water molecules from the main channel when displaced by incoming H₂O₂ molecules. A functional dynamic mechanism might open the minor channel.

There is no doubt that the major channel is the preferred entrance of H₂O₂ to the active site and has an important role in enzyme kinetics. Most mutations in the major channel to some extent hamper this ability. However, even when perturbed by mutations it conveys enough H₂O₂ molecules to the active site for a very effective catalysis. Mutations that widen the major channel in SCCA decreases catalytic activity and increase peroxidatic activity by increasing the accessibility to larger substrates.²¹ Nevertheless, the enzyme preferences for H₂O₂ over a relative small substrate like ethanol is still 10⁵. These results indicate that the major channel is designed to rapidly bring H₂O₂ molecules to the active site. The lower part of the channel in large catalases is very narrow, highly hydrophobic, and has an electrical potential that could orient H₂O₂ molecules at their entrance to the active site.⁵⁴ The system is so efficient that it can convey H₂O₂ molecules to the active site at a rate of 10⁷⁻⁸ molecules per second. Resulting products of this activity have to exit at a similar rate and other channels beside the main channel could serve this purpose. The hydrophilic central channel could function to rapidly dispose O₂, at least in the large catalases; the minor channel could drive the

displacement of water molecules from the main channel, and the lateral hydrophobic channel could be used to drain water molecules out of the protein. Further molecular dynamic analysis and experimental work is needed to analyze these possibilities.

Materials and Methods

Catalase activity and purification

Catalase (hydrogen peroxide:hydrogen peroxide oxido-reductase) (EC 1.11.1.6) activity was measured by determining the initial rate of dioxygen production with a Clark microelectrode.⁵⁵ Catalase activity in polyacrylamide gels was determined by zymograms of the gel after electrophoresis.¹⁸ The 74-ORS23-1A wild type strain from the Fungal Genetics Stock Center was grown in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of solid Vogel's minimal medium supplemented with sucrose and agar. CAT-1 was purified from conidiated cultures following the method described previously.^{4,18}

Sequencing of the N-terminus

Purified CAT-1 (15 µg) was separated by SDS-PAGE (10%) and then electroblotted to polyvinylidene difluorobenzene membranes, using 10 mM CAPS pH 11.0 with 10% methanol. Membrane was stained with 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 in 50% methanol and discoloured with 50% methanol and 10% acetic acid. Sequencing was done at the Département des Biotechnologies, Institut Pasteur.

Crystallization and diffraction

CAT-1 was concentrated to 9 mg/ml in 50 mM sodium and potassium phosphate, pH 7.8, in a Centricon-YM50 (Millipore) and was crystallized using the hanging drop vapour diffusion method in 2.0 M ammonium sulphate (Hampton Research) at 18°C. The drops were formed with 5 µl of protein plus 5 µl of

precipitant solution. CAT-1 crystals appeared after four days and were grown for about one month. They were hexagonal and had the characteristic green colour of CAT-1. A crystal of 0.36 x 0.20 x 0.02 mm cooled under nitrogen stream at 100K was diffracted at the 9-1-beam line of the Stanford Synchrotron Radiation Laboratory. Cryoprotecting solution was 31% glycerol (Sigma) in mother liquor. Reflections of 119 frames were autoindexed and integrated with denzo⁵⁶ and scaled with CCP4 suite.⁵⁷

Images were processed with denzo and CCP4 suite in two possible space groups, C2 and I222. Best statistic parameters were obtained with space group C2 (Table 1). In space group I222, R_{sym} 6.4%, $I/\sigma(I)$ 3.9 (All), data redundancy 2.1, with more than 6% rejected observations; rigid body refinement of the monomer gave an R-value of 54 (and R free of 57). During molecular replacement, I222 space group was reconsidered but discarded due to high R-values.

Structure determination and refinement

CAT-1 structure was determined at 1.75 Å resolution by the molecular replacement method using the co-ordinates of HP11 catalase of *E. coli*²⁶ as a starting model. Amino acid sequence identity between CAT-1 and HP11 is 45%. Rotation and translation were performed with CNS.⁵⁸ Ten percent of the data were randomly chosen and reserved to determine R_{free} . Alternating cycles of automatic and manual refinement were carried out using the annealing, minimising and bidual standard protocols of CNS. O program⁵⁹ was used to analyse the electronic density maps 2fo- ρ_c and fo- ρ_c , to build some parts of the CAT-1 model and for manual refinement. Strict non-crystallographic symmetry was employed at the beginning and then the dimer was generated by roto-translation. At the end the electronic density map was analysed repeatedly with the DDQ program.⁶⁰ Heme

groups were modelled with O and topology and parameters files were done with Hetero-compound Information Centre-Uppsala (HIC-Up). The solvent molecules were generated automatically with CNS. Structural alignments with other catalases were done with the O program.⁵⁹ Fifty-five catalase sequences from bacteria, fungi, animals and plants were considered. Figures 1, 2, 3, 4a and 7 were made with the Ribbons program;⁶¹ Figures 4b and 4c with the O program.⁵⁹

Co-ordinates and the structure factors of native CAT-1 have been deposited in the RCSB Protein Data Bank and have accession number 1SY7.

MALDI TOF mass spectrometry

Purified CAT-1 (2 µg) was separated in a SDS-PAGE (0.75 mm thick, 10% (w:v) acrylamide), stained with Coomassie Blue R250 (0.1% (w:v) in 10% (v:v) acetic acid, 50% (v:v) methanol) for 20 min and destained for 3 h in 10% (v:v) acetic acid, 50% methanol. CAT-1 protein band was excised from the gel and digest with 1 µg trypsin at 37° for 18 h. High resolution MALDI-MS was performed with 5% aliquot of the digest in a Micromass ToffSpec SE MALDI-MS instrument at the W. M. Keck Facility of Yale University.

Acknowledgements

We are grateful to P. C. Loewen and I. Fita for the HPII catalase co-ordinates and W. R. Melik-Adamyán for the PVC co-ordinates. This work is based upon research conducted at the Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (SSRL), which is funded by the Department of Energy (BES, BER) and the National Institutes of Health (NCRR, NIGMS). We thank Dr. Jesús Aguirre for critically reviewing the manuscript and Julio Lenin Domínguez for help with the program Ribbons. This research was supported by grant 33148N from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. A.D. received a CONACyT Ph.D.-fellowship and complementary stipend from DGEP, UNAM.

References

1. von Ossowski, I., Hauser, G. & Loewen, P. C. (1993). Molecular evolutionary analysis based on the amino acid sequence of catalase. *J. Mol. Evol.* **37**, 71-76.
2. Klotz, M. G., Klassen, G. R. & Loewen, P. C. (1997). Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Mol. Biol. Evol.* **14**, 951-958.
3. Lledías, F. & Hansberg, W. (2000). Catalase modification as a marker for singlet oxygen. *Methods Enzymol.* **319**, 110–119.
4. Díaz, A., Rangel, P., Montes de Oca, Y., Lledías, F. & Hansberg, W. (2001). Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1323-1333.
5. Switala, J. & Loewen, P. C. (2002). Diversity of properties among catalases. *Arch. Biochem. Biophys.* **401**, 145-154.
6. Hoffman B, Hecht, H. J. & Flohe, L. (2002). Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* **383**, 347–364.
7. Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., *et al.* (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, **422**, 859-868.
8. Michán, S., Lledías, F., Baldwin, J. D., Natvig, D. O. & Hansberg, W. (2002). Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 521-532.
9. Melik-Adamyan W. R., Barynin, V. V., Vagin, A. A., Borisov, V. V., Vainshtein, B. K., Fita, I., Murthy, M. R. & Rossmann, M. G. (1986). Comparison of beef liver and *Penicillium vitale* catalases. *J. Mol. Biol.* **188**, 63-72.
10. Bravo, J., Fita, I., Gouet, P., Jouve, H. M., Melik-Adamyan, W. &

- Murshudov, G. N. (1997). Structure of catalases. In *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses* (Scandalios, J. G., ed), pp.407-445, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
11. Hansberg, W. (1996). A hyperoxidant state at the start of each developmental stage during *Neurospora crassa* conidiation. *Ciência e Cultura*, **48**, 68–74.
 12. Peraza, L. & Hansberg, W. (2002). *Neurospora crassa* catalases, singlet oxygen and cell differentiation. *Biol. Chem.* **383**, 589-595.
 13. Klotz M. G. & Loewen, P. C. (2003). The molecular evolution of catalatic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from bacteria into eukaryota. *Mol. Biol. Evol.* **20**, 1098-112.
 14. Navarro, R.E., Stringer, M. A., Hansberg, W., Timberlake, W. E. & Aguirre J. (1996). *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr. Genet.* **29**, 352–359.
 15. Noventa-Jordão M. A., Couto R. M., Goldman M. H. S., et al., (1999). Catalase activity is necessary for heat-shock recovery in *Aspergillus nidulans* germlings. *Microbiol.* **145**, 3229-3234.
 16. Michán, S., Lledías, F. & Hansberg, W. (2003) Asexual development is increased in *Neurospora crassa cat-3* null mutant strains. *Eukaryot. Cell*, **2**, 798-808.
 17. Hansberg, W. & Aguirre J. (1990). Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell insulation from dioxygen. *J. Theor. Biol.* **142**, 201–221.
 18. Lledías, F., Rangel, P. & Hansberg, W. (1998). Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* **273**, 10630-10637.
 19. Lledías, F., Rangel, P. & Hansberg, W. (1999). Singlet oxygen is part of a hyperoxidant state generated during spore germination.

- Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1396–1404.
20. Lledias, F. & Hansberg, W. (1999). Oxidation of human catalase by singlet oxygen in myeloid leukemia cells. *Photochem. Photobiol.* **70**, 887-892.
 21. Zámoky, M. & Koller, F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, **72**, 19-66.
 22. Nicholls, P., Fita, I. & Loewen, P. C. (2001). Enzymology and structure of catalases. *Adv. Inorg. Chem.* **51**, 51-106.
 23. Lardinois, O. M., Mestdagh, M. M. & Rouxhet, P. G. (1996). Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta*, **1295**, 222-238.
 24. Switala, J., O'Neil, J. O. & Loewen, P. C. (1999). Catalase HP11 from *Escherichia coli* exhibits enhanced resistance to denaturation. *Biochemistry*, **38**, 3895-3901.
 25. Bravo, J., Verdaguer, N., Tormo, J., Betzel, C., Switala, J., Loewen, P. C. & Fita, I. (1995). Crystal structure of catalase HP11 from *Escherichia coli*. *Structure*, **3**, 491-502.
 26. Bravo, J., Mate, M. J., Schneider, T., Switala, J., Wilson, K., Loewen, P. C. & Fita, I. (1999). Structure of catalase HP11 from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution. *Proteins*, **34**, 155-166.
 27. Vainshtein, B. K., Melik-Adamyan, W. R., Barynin, V. V., Vagin, A. A. & Grebenko, A. I. (1981). Three-dimensional structure of the enzyme catalase. *Nature*, **293**, 411-412.
 28. Vainshtein B. K., Melik-Adamyan, W. R., Barynin, V. V., Vagin, A. A., Grebenko, A. I., Borisov, V. V., Bartels, K. S., Fita, I. & Rossmann, M. G. (1986). Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **188**, 49-61.

29. Berthet, S., Nykyri, L. M., Bravo, J., Mate, M. J., Berthet-Colominas, C., Alzari, P. M., Koller, F. & Fita, I. (1997). Crystallization and preliminary structural analysis of catalase A from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Science*, **6**, 481-483.
30. Maté, M. J., Zamocky, M., Nykyri, L. M., Herzog, C., Alzari, P. M., Betzel, C., Koller, F., Fita, I. (1999). Structure of catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **286**, 135-149.
31. Putnam, C. D., Arvai, A. S., Bourne, Y. & Tainer, J. A. (2000). Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* **296**, 295-309.
32. Ko, T. P., Safo, M. K., Musayev, F. N., Di Salvo, M. L., Wang, C., Wu, S. H. & Abraham, D. J. (2000). Structure of human erythrocyte catalase. *Acta Crystallog. sect. D*, **56**, 241-245.
33. Safo, M. K., Musayev, F. N., Wu, S. H., Abraham, D. J. & Ko, T. P. (2001). Structure of tetragonal crystals of human erythrocyte catalase. *Acta Crystallog. sect. D*, **57**, 1-7.
34. Murthy, M. R., Reid, T. J., 3rd., Sicignano, A., Tanaka, N. & Rossmann, M. G. (1981). Structure of beef liver catalase. *J. Mol. Biol.* **152**, 465-499.
35. Fita, I., Silva, A. M., Murthy, M. R. N. & Rossmann, M. G. (1986). The refined structure of beef liver catalase at 2.5 resolution. *Acta Crystallog. sect. B*, **42**, 497-515.
36. Gouet, P., Jouve, H-M. & Dideberg, O. (1995). Crystal structure of *Proteus mirabilis* PR catalase with and without bound NADPH. *J. Mol. Biol.* **249**, 933-54.
37. Murshudov, G. N., Melik-Adamyanyan, W. R., Grebenko, A. I., Barynin, V. V.,

- Vagin, A. A., Vainshtein, B. K., Dauter, Z. & Wilson, K. S. (1992). Three-dimensional structure of catalase from *Micrococcus lysodeikticus* at 1.5 Å resolution. *FEBS Lett.* **312**, 127-131.
38. Murshudov, G. N., Grebenko, A. I., Brannigan, J. A., Antson, A. A., Barynin, V. V., Dodson, G. G., Dauter, Z., Wilson, K. S. & Melik-Adamyanyan, W. R. (1992). The structures of *Micrococcus lysodeikticus* catalase, its ferryl intermediate (compound II) and NADPH complex. *Acta Crystallogr sect. D*, **58**, 1972-1982.
39. Carpena, X., Soriano, M., Klotz, M. G., Duckworth, H. W., Donald, L. J., Melik-Adamyanyan, W., Fita, I. & Loewen, P. C. (2003). Structure of the Clade I catalase, CatF of *Pseudomonas syringae*, at 1.8 Å resolution. *Proteins*, **50**, 423-436.
40. Loewen, P. C., Switala, J., von Ossowski, I., Hillar, A., Christie, A., Tattrie, B. & Nicholls, P. (1993). Catalase HPII of *Escherichia coli* catalyzes the conversion of protoheme to *cis*-heme *d*. *Biochemistry*, **32**, 10159-10264.
41. Maté, M. J., Servinc, M. S., Hu, B., Bujons, J., Bravo, J., Switala, J., Ens, W., Loewen, P. C. & Fita, I. (1999). Mutants that alter the covalent structure of catalase hydroperoxidase II from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**, 27717-27725.
42. Jouve, H. M., Gaillard, J. & Pelmont, J. (1984). Characterization and spectral properties of *Proteus mirabilis* PR catalase. *Can. J. Biochem. & Cell Biol.* **62**, 935-944.
43. Brindle, N. J., North, A. C. & Brown, S. B. (1986). Theoretical prediction and experimental measurement of the bile-pigment isomer pattern obtained from degradation of catalase haem. *Biochem. J.* **236**, 303-306.
44. Carpena, X., Loprasert, S., Mongkolsuk, S., Switala, J., Loewen, P. C. &

- Fita, I. (2003). Catalase-peroxidase KatG of *Burkholderia pseudomallei* at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **327**, 475-489.
45. Bravo, J., Fita, I., Ferrer, J. C., Ens, W., Hillar, A., Switala, J. & Loewen, P. C. (1997). Identification of a novel bond between a histidine and the essential tyrosine in catalase HPII of *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **6**, 1016-1023.
46. Rovira, C & Fita, I. (2003). The Proximal Hydrogen-Bonded Residue Controls the Stability of the Compound II Intermediate of Peroxidases and Catalases. *J. Phys. Chem. B* **107**, 5300 - 5305.
47. Hillar, A., Nicholls, P., Switala, J. & Loewen, P. C. (1994). NADPH binding and control of catalase compound II formation: comparison of bovine, yeast, and *Escherichia coli* enzymes. *Biochem. J.* **300**, 531-539.
48. Bicout, D. J., Field, M. J., Gouet, P. & Jouve, H. M. (1995). Simulations of electron transfer in the NADPH-bound catalase from *Proteus mirabilis* PR. *Biochim. Biophys. Acta*, **1252**, 172-176.
49. Olson, L., P. & Bruice, T. C. (1995). Electron tunneling and *ab initio* calculations related to one-electron oxidation of NAD(P)H bound to catalase. *Biochemistry*, **34**, 7335-7347.
50. Melik-Adamyany, W., Bravo, J., Carpena, X., Switala, J., Mate, M. J., Fita, I. & Loewen, P. C. (2001). Substrate flow in catalases deduced from the crystal structures of active site variants of HPII from *Escherichia coli*. *Proteins*, **44**, 270-281.
51. Sevinc, M. S., Mate, M. J., Switala, J., Fita, I. & Loewen, P. C. (1999). Role of the lateral channel in catalase HPII of *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **8**, 490-498.
52. Amara, P., Andreoletti, P., Jouve, H. M. & Field, M. J. (2001). Ligand diffusion in the catalase from *Proteus mirabilis*: a molecular dynamics study. *Protein Sci.* **10**, 1927-1935.

53. Kalko, S. G., Gelpi, J. L., Fita, I. & Orozco, M. (2001). Theoretical study of the mechanisms of substrate recognition by catalase. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 9665-9672.
54. Chelikani, P., Carpena, X., Fita, I. & Loewen, P. C. (2003). An electrical potential in the access channel of catalases enhances catalysis. *J. Biol. Chem.* **278**, 31290-31296.
55. Rørth, M. & Jensen, P. K. (1976). Determination of catalase activity by means of the Clark oxygen electrode. *Biochim. Biophys. Acta* **139**, 171-173.
56. Otwinowski, Z. (1993). *Data Collection and Processing* (Sawyer, L., Isaacs, N. & Bailey, S., eds), pp 56-62, Science and Engineering Research Council, Warrington, UK.
57. Collaborative Computational Project, No. 4 (1994). The CCP4 Suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallog. sect. D*, **50**, 760-767.
58. Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., *et al.* (1998). Crystallography and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallog. sect. D*, **54**, 905-921.
59. Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in those models. *Acta Crystallog. sect. A*, **47**, 110-119.
60. van den Akker, F. & Hol, W. G. J. (1999). Difference density quality (DDQ): a method to assess the global and local correctness of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallog. sect. D*, **55**, 206-218.
61. Carson, M. (1997). "Ribbons". *Methods Enzymol.* **277**, 493-505.

Table I.- Crystallographic parameters
and refinement statistics

A. Parameters

| | |
|----------------------|---------------------------|
| Unit cell | |
| a (Å) | 130.00 |
| b (Å) | 182.24 |
| c (Å) | 90.36 |
| β (deg.) | 133.41 |
| Resolution (Å) | 15.0 - 1.75 (1.86 - 1.75) |
| Unique reflections | 153 020 |
| Completeness (%) | 89 (89.8) |
| I/ σ (I) | 8.6 (2.3) |
| R _{sym} (%) | 5.9 (32.6) |
| Data redundancy | 2.4 (2.3) |
| Mosaicity | 0.9 |

B. Refinement

| | |
|------------------------|-------------|
| Resolution limits (Å) | 15.0 - 1.75 |
| R _{cryst} (%) | 18.3 |
| R _{free} (%) | 20.6 |
| Protein atoms | 11 050 |
| Heme atoms | 174 |
| Solvent atoms | 1 725 |
| Bond lengths (Å) | 0.008 |
| Bond angles (deg.) | 1.40 |

C. Average B value (Å²)

| | |
|---------|-------|
| Protein | 18.41 |
| Heme | 9.60 |
| Solvent | 38.61 |

Figure legends

Figure 1. Alpha helices and β -strands in the CAT-1 monomer. Alpha helices are in light blue, 3_{10} helices in dark blue, and β -strands in green. Numbers are used as in other catalases. Some small helices and β -strands are not numbered and correspond to numbers with primes in the text.

Figure 2. Structure of CAT-1. (a) Stereo view of CAT-1 monomer with β -sheets in green, α -helices in blue, helices 3_{10} in dark blue and coils in orange. View is from the Q axis and the P and R axes are in plane with the page. The heme (in red) lies between the β -barrel and the α -helices 3 and 9. (b) Stereo view of a CAT-1 dimer with one subunit as in (a) and the Q related subunit with the α -helices and coils in dark blue. The N-terminal arm of each subunit interacts with the wrapping domain of the other subunit. (c) Stereo view of the CAT-1 tetramer formed by dimers, one as shown in (b) and the second having the α -helices and coils of one subunit in yellow and the other subunit in purple. The open face of each subunit is closed and buried upon formation of the tetramer.

Figure 3. Main chain superposition of CAT-1, HP11 and PVC. (a) Stereo view of the CAT-1 monomer. Compared to HP11 (green) and PVC (blue), CAT-1 (red) has an extra sequence at the beginning of the structured part of the amino-terminal arm (L1) and the coil to the carboxy-terminal domain is smaller. Compared to CAT-1 and PVC, HP11 has a much longer amino-terminal end. (b) Stereo view of the carboxy-terminal domain. CAT-1 has an extra loop (L2) and an additional β strand (β 16) that is antiparallel to β 17. Compared to CAT-1 and HP11, PVC has an extra sequence (LL), it lacks β 11 and β 12 and has a loose and differently oriented carboxy-terminal end.

Figure 4. Distal and proximal sides of the CAT-1 active site. (a) Side view. Conserved amino acids and water molecules are indicated. (b) Top view. 2fo-fc map with $\sigma=1.6$. Heme *b* is partially oxidized to heme *d*. Heme *d* possibly arises through di-hydroxylation by singlet oxygen at the C5-C6 double bond of pyrrole ring III and a subsequent formation of a *cis*- γ -spirolactone in C6. The C5-C6 double bond also marks the start of the central channel. (c) Covalent bond between the sulfur of Cys356 and the C β of Tyr379. Shown is the electron density in a 2fo-fc map with $\sigma = 1.0$. The distance between them the sulfur and the C β is indicated. A possible mechanism for the formation of the covalent bond is indicated in Fig. 6.

Figure 5. Mass spectrometry analysis of the CAT-1-trypsin peptides. A peptide with a mass of 5,154 confirms the bound between the peptide carrying Thy379 (3,778.8) and the peptide having Cys356 (1,377.6).

Figure 6. Proposed mechanism for the origin of the Cys-Tyr covalent bond. A tyrosine cationic radical is reduced by the vicinal Cys356 forming a thiyl radical that induces deprotonation of Tyr379 β -carbon and formation of the covalent bond.

Figure 7. Main, central, and lateral channel. (a) Main channel. Shown are the water molecules and the conserved amino acids that conform the channel. There is a funnel shaped entrance to a small cavity, a gate at Ser198 and the narrow hydrophobic inlet to the active site. Water molecules of the channel and the nearest path to the outlet are in light blue; water molecules of the small cavity are in red. (b) Central channel and central cavity. The channel is conformed by $\alpha 9$ helix and the two terminal arms of the R related subunits. It goes from porphyrin ring III to the central cavity. The figure shows the heme group, the water molecules of the

channel (light blue), the interacting amino acids of the P-related subunit (magenta), some amino acids of the R-related (yellow) and of the Q-related subunit (blue), and some water molecules of the central cavity (red). (c) Lateral channel. It goes from the proximal side of the active site to the α -helical domain. Water molecules are in light blue.

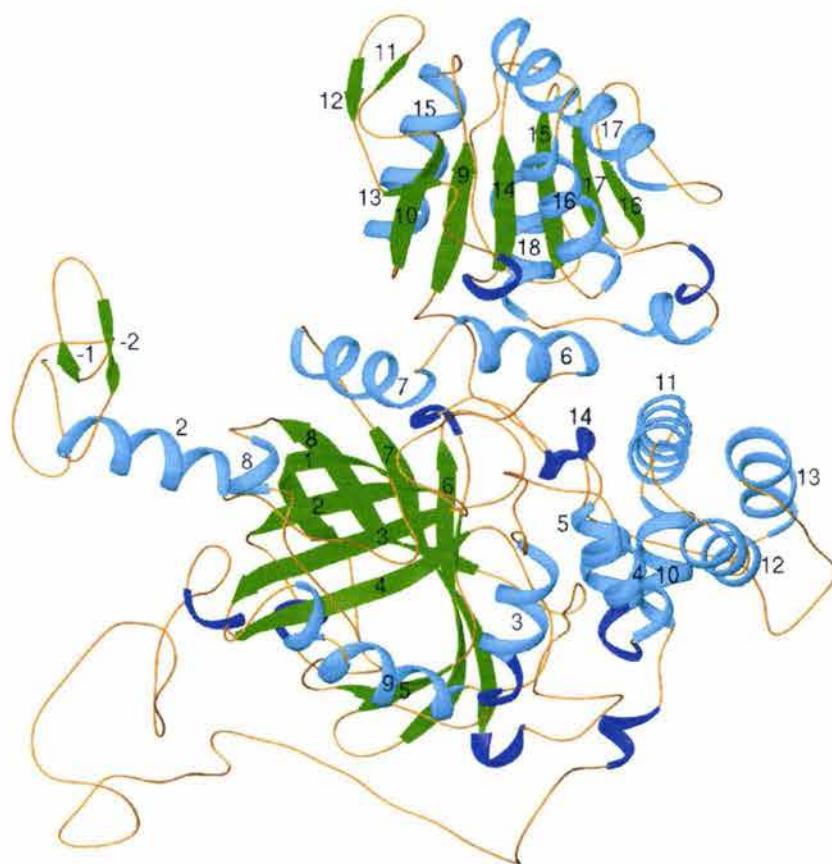


Fig. 1

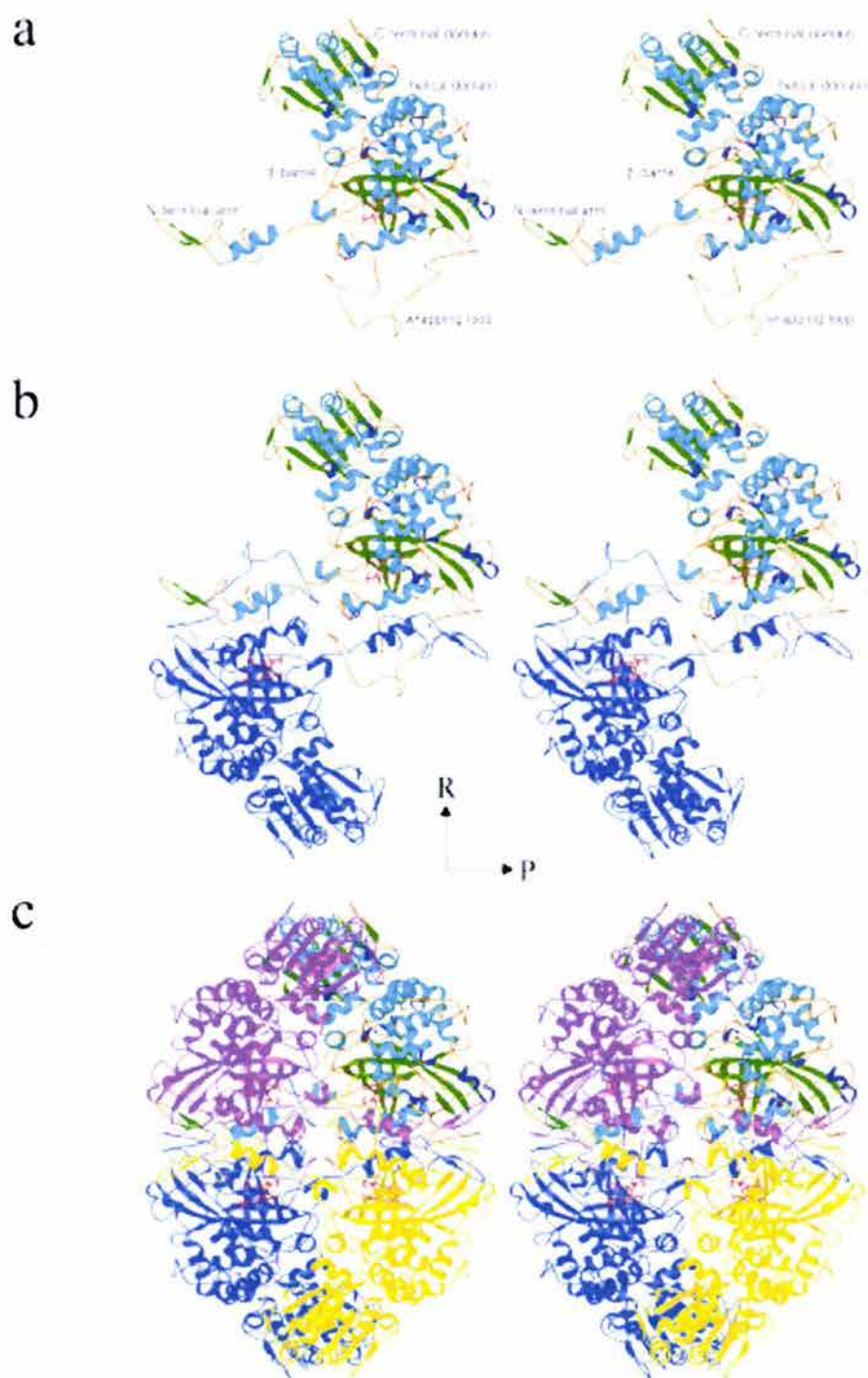


Fig. 2

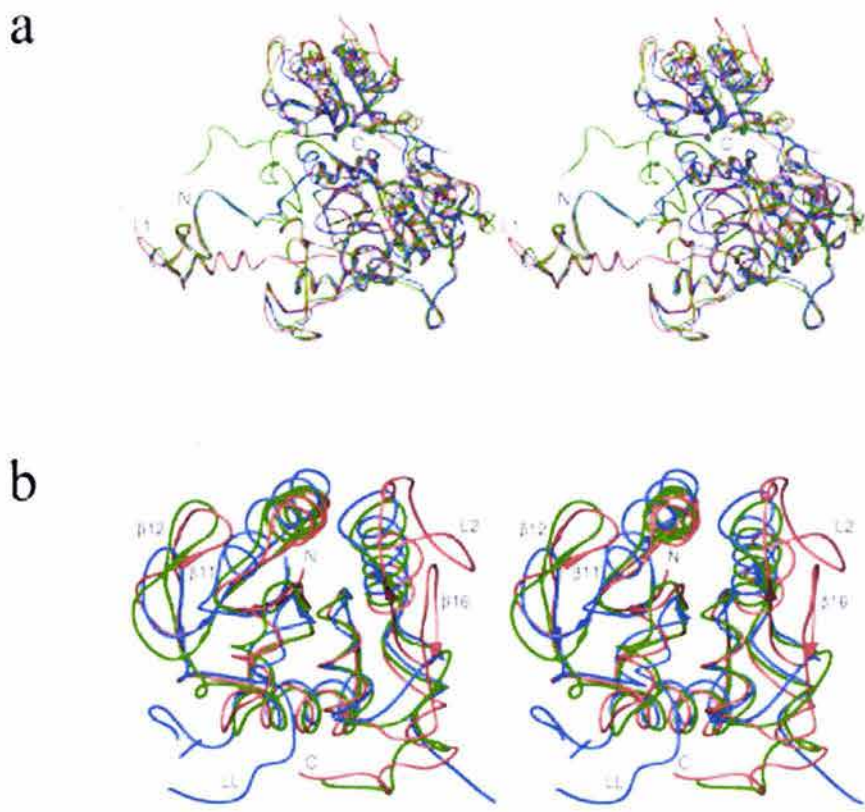


Fig. 3

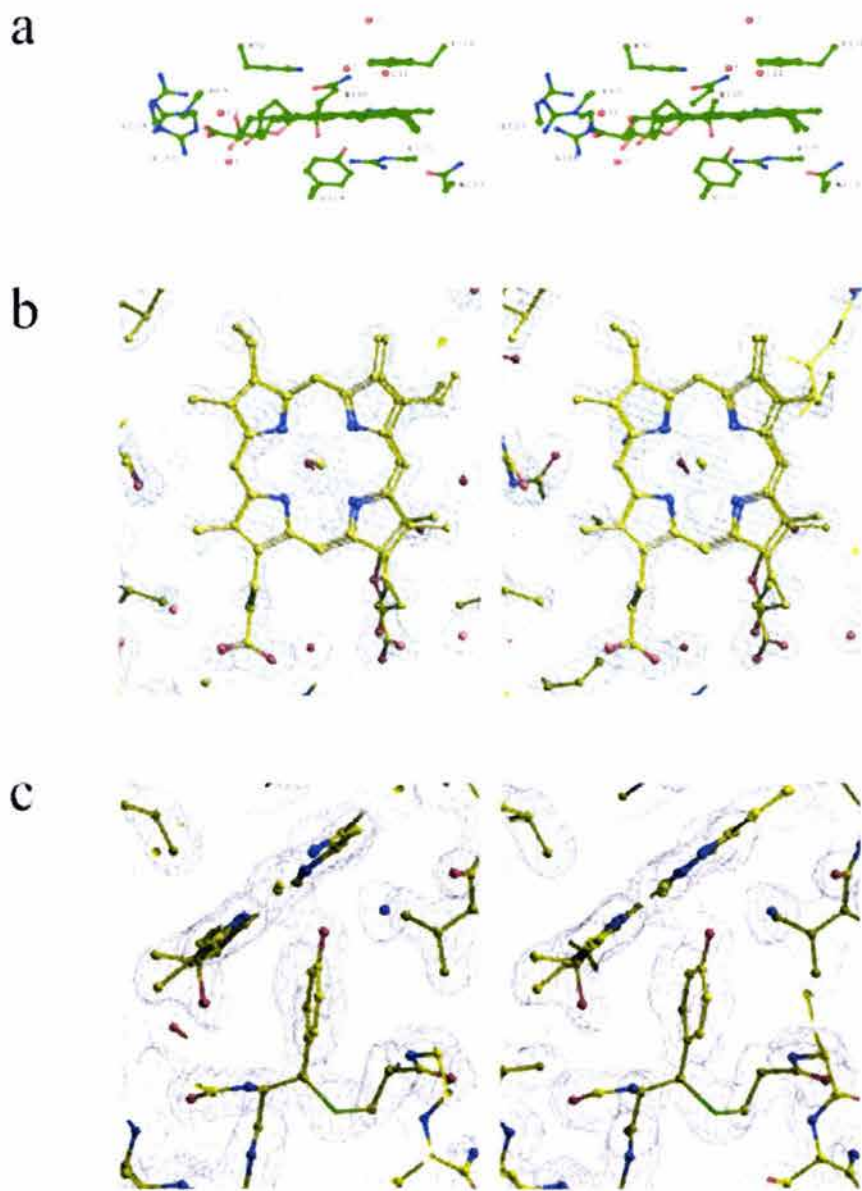


Fig. 4

NPDEFFPQTEQIAFCTSHV VNGIGFSDDPLLQGR
|
NFSYFDTQISR

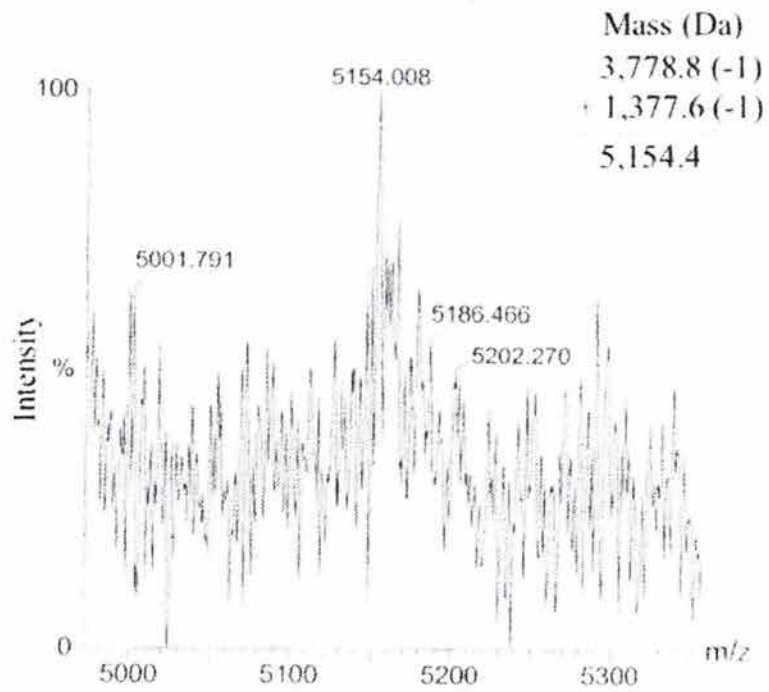


Fig. 5

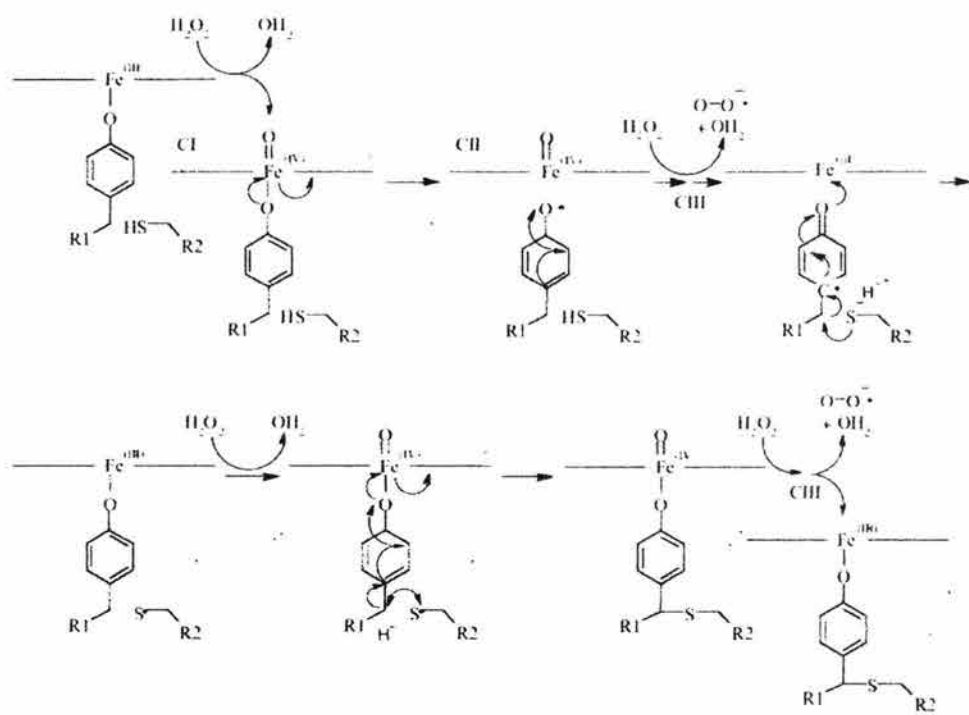


Fig. 6

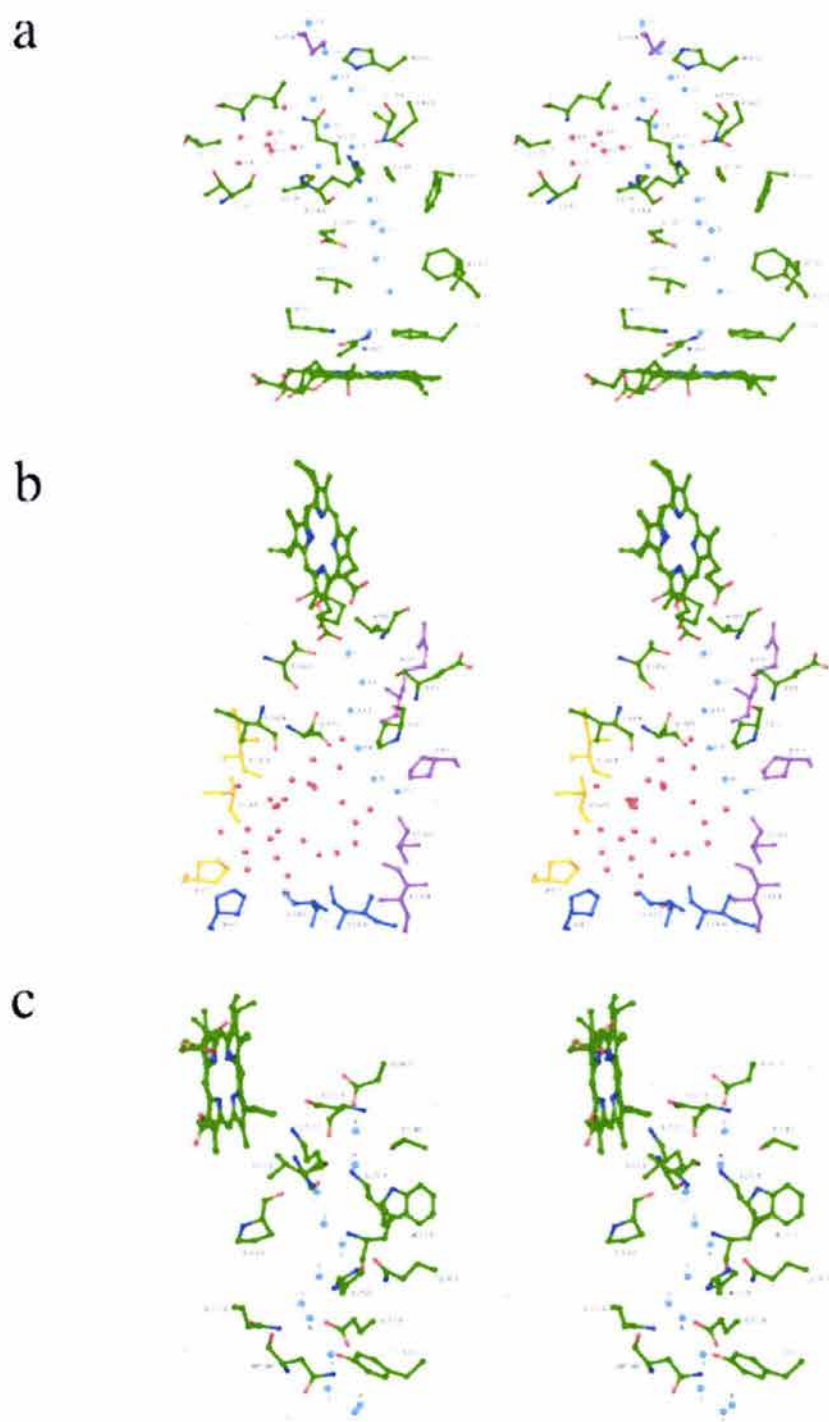


Fig. 7