

LA ESTRUCTURA DE LAS CATALASAS*

ADELAIDA DÍAZ

RESUMEN

La catalasa es una enzima antioxidante presente en la mayoría de los organismos aerobios. Cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. La mayoría de estas enzimas son homotetrámeros con un grupo hemo en cada subunidad. Se ha determinado la estructura cristalográfica de nueve catalasas. Algunas catalasas tienen subunidades pequeñas (masa molecular ≈ 60 kDa) y otras grandes (masa molecular > 80 kDa). Entre estos dos tipos de catalasas existen diferencias estructurales importantes. Las catalasas pequeñas son menos resistentes a la desnaturalización, unen NADPH, tienen hemo *b* y se inhiben e inactivan por sustrato. En cambio, las catalasas grandes tienen un dominio extra en el C-terminal que es semejante a la flavodoxina, son muy resistentes a la desnaturalización, tienen hemo *d*, presentan enlaces covalentes inusuales cercanos al sitio activo y son resistentes a concentraciones molares de H_2O_2 . Aquí revisamos los aspectos estructurales de las catalasas y sus posibles implicaciones funcionales.

PALABRAS CLAVE: catalasa, hemo *b*, hemo *d*, enlaces covalentes inusuales, dominio semejante a la flavodoxina.

ABSTRACT

Catalase, an antioxidant enzyme present in most aerobic organisms, dismutates hydrogen peroxide into water and oxygen. Most of these enzymes are homotetramers with one heme per subunit. The structure of nine catalases has been determined. Catalases have either small subunits (molecular mass ≈ 60 kDa); or large ones (molecular mass > 80 kDa). There are important structural differences between small and large catalases. Small catalases are less resistant to denaturation, they bind NADPH, have heme *b* and are inhibited and inactivated by substrate. Large catalases are very resistant to denaturation, they have a C-terminal flavodoxin-like domain, contain heme *d*, present unusual covalent bonds near the active site and are resistant to molar H_2O_2 concentrations. Here we review structural aspects of catalases and their possible functional implications.

KEY WORDS: catalase, heme *b*, heme *d*, unusual covalent bonds, flavodoxin-like domain.

INTRODUCCIÓN

a) La función de la catalasa

Las especies de oxígeno reactivas como el radical superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se forman durante la reducción del dioxígeno en agua. Estas especies pueden dañar las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos, por lo que se requieren sistemas antioxidantes eficientes, entre los que se in-

cluyen ciertas enzimas. El peróxido de hidrógeno se forma por la dismutación del radical superóxido y también en la reacción de algunas oxidasas. Hay varias enzimas capaces de degradar el peróxido de hidrógeno: las catalasas, las peroxidases y las peroxirredoxinas (1, 2). Las peroxidases eliminan el H_2O_2 usándolo para oxidar otros sustratos. A diferencia de las otras enzimas, que requieren

de un sustrato reducido, las catalasas dismutan el peróxido de hidrógeno. Se han identificado tres grupos de catalasas: i) las catalasas monofuncionales, que contienen hemo y están presentes tanto en los organismos procariotas como en los eucariotas, ii) las Mn-catalasas, que son enzimas hexaméricas que no tienen hemo, tienen Mn en el sitio activo y sólo están presentes en algunos organismos

* Recibido: 10 de diciembre de 2002. Aceptado: 11 de marzo de 2003

Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. México, D. F. C. P. 04510. Teléfono: 5622 5655, Fax: 5622 5630. Correo E: adiaz@ifisiol.unam.mx.

procariotos anaerobios y iii) las catalasas-peroxidasas, que tienen actividad de catalasa y de peroxidasa, contienen hemo y sólo están presentes en las bacterias y los hongos (3).

La mayoría de los organismos aerobios tienen catalasas monofuncionales. Las catalasas catalizan la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y dióxígeno evitando así que se forme el radical hidroxilo y el oxígeno singlete, especies de oxígeno que son muy reactivas. En el hombre, la catalasa protege la hemoglobina del peróxido de hidrógeno que se genera en los eritrocitos. También tiene un papel de protección en la inflamación, en la prevención de mutaciones, evita el envejecimiento y cierto tipo de cáncer. Las mutaciones en el gen de la catalasa pueden resultar en la enfermedad hereditaria denominada acatalasemia que entre otros síntomas se reconoce por un incremento en la incidencia de ulceraciones bucales (3, 4).

b) El mecanismo de reacción

En la reacción de la catalasa ocurre la transferencia de dos electrones entre dos moléculas de peróxido de hidrógeno en la cual 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 formando un intermediario llamado compuesto I. El compuesto I se caracteriza por tener un grupo ferroxilo con FeIV y un radical catiónico de porfirina. En esta reacción se produce una molécula de agua (Reacción 1). En el segundo paso de la reacción, el compuesto I es reducido por otra molécula de peróxido regresando la catalasa a su estado inicial y produciendo agua y dióxígeno (Reacción 2).

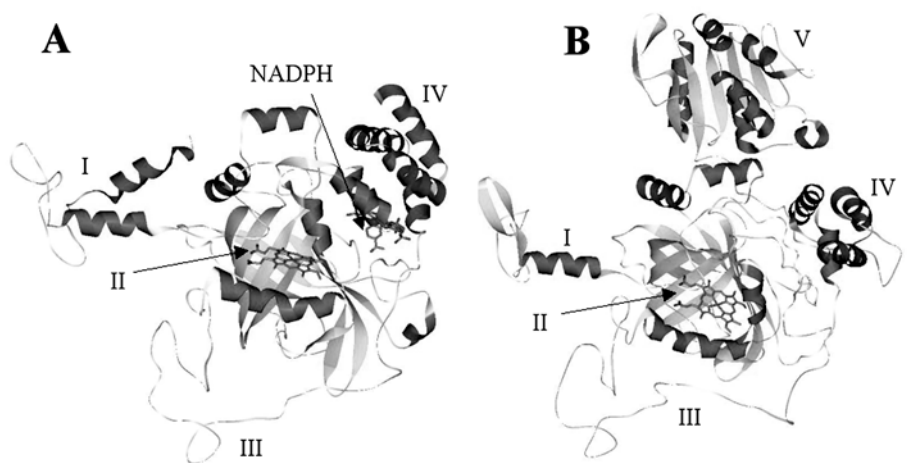


Figura 1. A. El monómero de la catalasa de eritrocitos humanos (HEC), una catalasa pequeña. B. El monómero de la catalasa-1 de *N. crassa* (CAT-1), una catalasa grande. El dominio I corresponde al N-terminal, II es el barril β que contiene el hemo, III es la asa envolvente, IV es el dominio de hélices y V es el C-terminal con topología semejante a la flavodoxina. También se muestra la molécula de NADPH unida a la catalasa pequeña.

En ciertas condiciones el compuesto I puede captar un electrón originando el compuesto II. El compuesto II tiene un estado de oxidación intermedio a los observados en el compuesto I y la catalasa en reposo. Al reaccionar con una molécula de H_2O_2 forma el compuesto III, que tiene un estado de oxidación FeVI. El compuesto II y el compuesto III son inactivos catalíticamente.

La catalasa también puede catalizar ciertas reacciones como peroxidasa. En la reacción de peroxidasa de la catalasa, el compuesto I puede oxidar el metanol, el etanol, el formato o el nitrato utilizando una molécula de H_2O_2 como oxidante (5). En el cerebro, la reacción de la catalasa con el etanol forma acetaldehído (Reacción 3), que explica algunos de los efectos neurológicos del alcohol en humanos (4).

c) Antecedentes

Las catalasas monofuncionales son de dos tipos: las catalasas con subunidades pequeñas (masa molecular \approx

60 kDa) y las catalasas con subunidades grandes (masa molecular $>$ 80 kDa). Las primeras (Fig. 1A) se encuentran en los mamíferos, las plantas, los hongos y la mayoría de las bacterias y tienen la característica de unir NADPH y de ser inhibidas e inactivadas por sustrato. La unión del NADPH es para prevenir la acumulación del compuesto II y III (4, 5). Las catalasas grandes sólo están presentes en los hongos y en las bacterias, no unen NADPH, tienen un dominio en el C-terminal semejante a la flavodoxina y son resistentes al H_2O_2 (Fig. 1B) (5-7).

Un estudio cinético muestra que la catalasa de hígado de bovino (BLC: "bovine liver catalase"), que es una catalasa pequeña, se inhibe reversiblemente y se inactiva irreversiblemente a partir de 200 mM de H_2O_2 , mientras que la catalasa R de *Aspergillus niger*, que es una catalasa grande, no muestra inhibición reversible e inactivación irreversible con 2 M de sustrato. La inhibición reversi-

ble de la BLC se debe a la acumulación del compuesto III (5). Otra catalasa grande que no se inhibe reversiblemente y no se inactiva irreversiblemente con altas concentraciones de H_2O_2 (3 M) es la Catalasa-1 de *Neurospora crassa* (CAT-1). Además de su resistencia al H_2O_2 , la CAT-1 presenta cooperatividad en altas concentraciones de sustrato (> 200 mM) (Díaz A, Muñoz-Clares R A y Hansberg W. Manuscrito en preparación).

Para poder entender estas diferencias funcionales es importante conocer la estructura tridimensional de las distintas catalasas. Estableciendo correlaciones estructura-función se podrá desentrañar el mecanismo íntimo de la reacción.

Se ha determinado la estructura tridimensional de nueve catalasas. Cuatro de estas catalasas son de procarionotes: de *Micrococcus lysodeikticus* (MLC) (3,8), de *Proteus mirabilis* (PMC) (9), la HP11 de *Escherichia coli* (HP11) (10, 11) y la de *Pseudomonas syringae* (CatF) (12), y cinco catalasas son de eucariotes: la catalasa de bovino (BLC) (13, 14), la de *Penicillium vitale* (PVC) (15), la catalasa A de *Saccharomyces cerevisiae* (SCCA) (1), la catalasa de eritrocitos humanos (HEC) (4) y la CAT-1 de *N. crassa* (Díaz A, Rudiño-Piñera E, Arreola R, Horjales E y Hansberg W. Manuscrito en preparación). Las catalasas anteriores son catalasas pequeñas excepto la HP11, la PVC y la CAT-1. Estas catalasas son homotetrámeros, tienen un grupo hemo por subunidad y una simetría molecular 222. La simetría molecular 222 está presente en varias enzimas y 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. Si a una subunidad se le aplica una rotación de 180° en el eje X, otra de 180° en Y y otra de 180° en Z se puede generar el

tetrámero. Lo anterior indica que las catalasas son tetrámeros con subunidades simétricas ó idénticas (15).

DESCRIPCIÓN DE LA ORGANIZACIÓN DE LAS CATALASAS

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

El amino terminal comprende desde el primer aminoácido hasta el residuo de histidina esencial catalítico. Esta región de aproximadamente 60 aminoácidos tiene poca similitud entre las secuencias de las catalasas y se observa como un brazo torcido que se entierra en las subunidades vecinas. Contiene a la hélice $\alpha 2$ que es el primer elemento de estructura secundaria común en las catalasas. La HP11 tiene el amino terminal más largo, con 90 aminoácidos (16). En tres estructuras de catalasa los primeros aminoácidos del amino terminal están desordenados, en la SCCA son los primeros 14 aminoácidos (1), en la HP11 de *E. coli* son los primeros 26 aminoácidos (10-11) y en la CAT-1 de *N. crassa* son los primeros 17 aminoácidos (Díaz A, Rudiño-Piñera E, Arreola R, Horjales E y Hansberg W. Manuscrito en preparación), por lo que no se observan en los mapas de densidad electrónica y no se incluyen en los modelos moleculares.

El barril β con ocho hebras antiparalelas es el dominio más conservado de las catalasas; se clasifica como estructura $\alpha+\beta$ y abarca aproximadamente 260 aminoácidos (15). Las primeras cuatro hebras ($\beta 1-4$) son consecutivas y están separadas por tres hélices ($\alpha 3-5$) del segundo grupo de cuatro hebras ($\beta 5-8$). La primera mitad del barril β contiene la histidina y la asparagina esenciales

del sitio activo. La continuidad de los puentes de hidrógeno entre las hebras del barril β se pierde entre las hebras $\beta 4$ y $\beta 5$ donde hay sólo dos puentes de hidrógeno con la asparagina esencial. La hebra $\beta 5$ es irregular porque tiene tres aminoácidos (Ser196, His197 y Thr198 en PMC) que no participan en la hoja β . Lo anterior permite que el amino terminal de la hebra $\beta 5$ se una a las hebras $\beta 4$ y $\beta 6$ para cerrar el barril β . Entre las hebras $\beta 6$ y $\beta 7$ hay dos hélices ($\alpha 6$ y $\alpha 7$) (16). La segunda mitad del barril funciona para unir el NADPH en las catalasas BLC (13, 14), PMC (9), MLC (3, 8), SCCA (1) y HEC (4). La última hélice ($\alpha 8$) es una hélice tipo π en BLC (14), PVC (15), CAT-1 y posiblemente en todas las otras estructuras de catalasa.

El asa envolvente abarca alrededor de 110 aminoácidos que unen el barril β con el dominio de las hélices. Esta región tiene poco contenido de estructura secundaria repetitiva, contiene una hélice ($\alpha 9$) con la tirosina esencial que coordina el Fe.

El dominio de las hélices, con aproximadamente 60 aminoácidos, está formado por cuatro hélices contiguas ($\alpha 10-13$), bien definidas que son parecidas a las encontradas en las globinas (Fig. 1A y 1B) (15).

La principal diferencia estructural entre las catalasas pequeñas y las grandes es la presencia, en estas últimas de un dominio extra en el carboxilo terminal de aproximadamente 150 aminoácidos. Éste es un dominio del tipo α/β formado por cuatro hélices alfa ($\alpha 15-18$) y ocho hebras β ($\beta 9-16$) cuya topología es semejante a la flavodoxina (Fig. 1B). Se desconoce la función de este dominio y no hay evidencia experimental de que pueda unir nucleótidos (16).

Las catalasas que carecen del dominio C-terminal unen una molécula de NADPH. En las catalasas grandes, los aminoácidos entre el domi-

nio de las hélices y el C-terminal cubren el sitio de unión del NADPH, impidiendo la unión del cofactor en las catalasas PVC, HPII y CAT-1.

La dimerización en las catalasas pequeñas y grandes se da por el entrelazamiento mutuo de los monómeros. El amino terminal de un monómero se entrelaza con el asa envolvente del otro monómero (Fig. 2A). El tetrámero es un dímero de dímeros unidos fuertemente, que tiene una estructura muy compacta con dimensiones de 150 x 100 x 80 Å en las catalasas grandes (Fig. 2B) (16).

Las catalasas son enzimas muy resistentes y estables. Sin embargo, las catalasas grandes son más resistentes que las pequeñas. La HPII y la CAT-1 son más resistentes a altas temperaturas que la BLC. Así, la BLC se inactiva completamente al incubarla por 30 min a 64°C, mientras que la HPII lo hace en 20 min a 86°C y la CAT-1 pierde sólo el 50% de su actividad después de 70 min a 93°C. La HPII y la CAT-1 también son resistentes a detergentes (1% SDS) y agentes desnaturizantes como urea (9 M) o guanidina-HCl (4 M). En cambio, en estas condiciones la BLC se inactiva completamente (17, 18). Se ha visto que la alta resistencia de las catalasas al calor y los desnaturizantes se debe en parte al entrelazamiento de los monómeros para formar dímeros activos muy estables. El dominio C-terminal en las catalasas grandes como la HPII y la CAT-1, así como los carbohidratos unidos a la CAT-1 podrían contribuir también a su estabilidad. La glicosilación también se ha reportado en otras catalasas grandes de hongos como la CatR de *A. niger* y la CatB de *Aspergillus nidulans* (11, 18).

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 enterra-

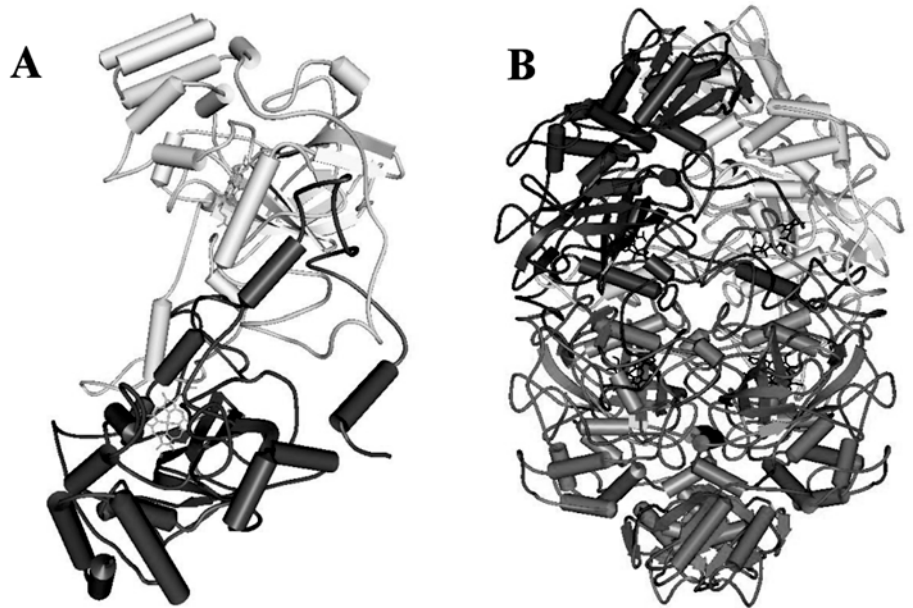


Figura 2. A. El dímero de una catalasa pequeña (BLC). Se muestra como están entrelazados los monómeros. B. El tetrámero de una catalasa grande (HPII).

do 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 (15, 16, 19). Los grupos propionato del hemo están enterrados y estabilizados por puentes salinos con tres argininas conservadas.

En la PVC, la HPII, la CAT-1 y la CatF el hemo está invertido, esto es, está rotado 180° con respecto al he-

mo de las catalasas BLC, PMC, MLC, SSCA y HEC (Fig. 3A) (8-19, Díaz A, Rudiño-Piñera E, Arreola R, Horjales E y Hansberg W. Manuscrito en preparación), de tal manera que los grupos metilo y vinilo de los anillos I y II cambian sus posiciones (Fig. 3B). La CatF de *P. syringae* es la única catalasa pequeña en donde se describe la inversión del hemo

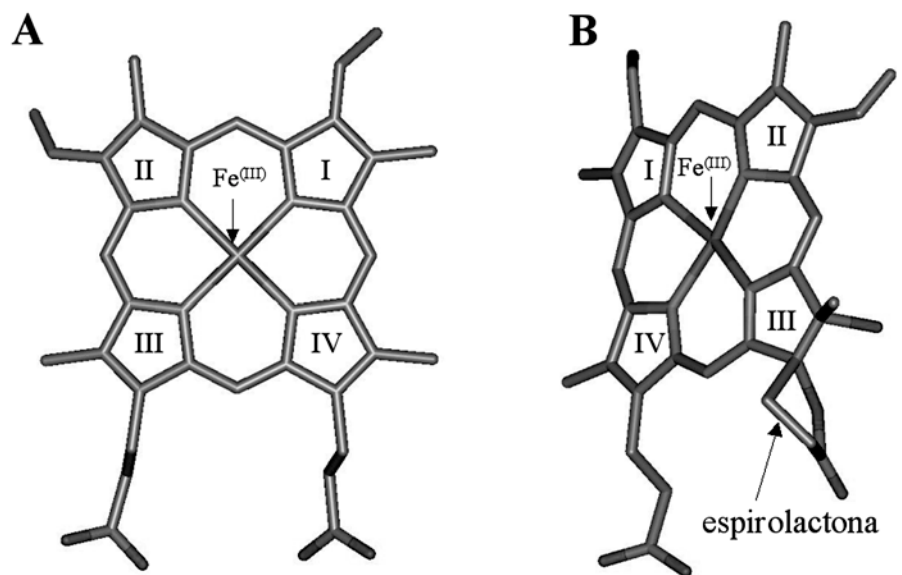


Figura 3. A. El hemo b (*Fe* protoporfirina IX) en la catalasa humana (HEC). B. El hemo d de la CAT-1 donde se muestra el anillo de la espirolactona. El hemo d tiene una rotación de 180° respecto al hemo b de la HEC.

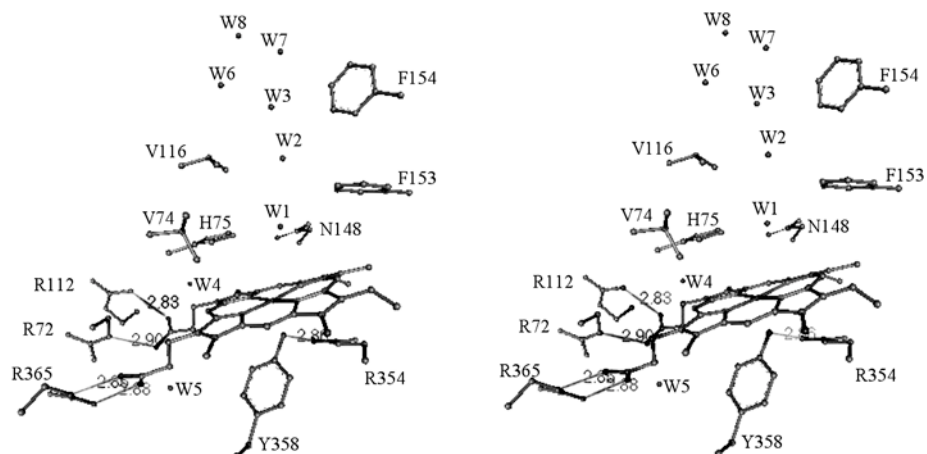


Figura 4. Sitio activo en estereo de la catalasa humana (HEC). Se muestran los aminoácidos esenciales Y358, H75 y N148, las argininas R112, R72 y R365 que hacen puentes salinos con los propionatos del hemo, las moléculas de agua W1-W8 y algunos de los aminoácidos hidrofóbicos que forman el canal principal V74, V116, F153 y F154.

(12). La inversión del hemo también se ha descrito en otras hemoproteínas como la mioglobina y el citocromo *b5* (19). Se desconoce si la inversión del hemo en las catalasas tiene un efecto funcional (16).

El hemo divide la cavidad donde se encuentra en dos: 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 His y una Asn en el lado distal y una Tyr en el lado proximal del hemo. El oxígeno de la Tyr esencial se coordina con el FeIII del hemo. El lado distal de la cavidad del hemo es muy hidrofóbico y tiene varias Phe conservadas (Fig. 4) (15, 16). Otro aminoácido hidrofóbico importante en el lado distal del hemo es el que precede a la His esencial, el cual es una valina en PVC, BLC, HPII, SCCA, HEC y CAT-1, una Met en PMC y una *cis*-Pro en MLC. Este aminoácido está en contacto directo con el anillo del hemo y en la PMC la metionina está oxidada formando una metionina sulfona. La sulfona impide el acceso de algunos compuestos grandes al sitio activo (9). Al cambiar la valina 111 por una alanina en la SCCA, la enzima tiene

una actividad de catalasa reducida pero la actividad de peroxidasa aumenta para los sustratos grandes (1).

En la cavidad distal del hemo de todas las estructuras de catalasas existen moléculas de agua que están relativamente fijas (3). El sustrato llega al sitio activo a través de un canal hidrofóbico de 25 Å de largo que está lleno de moléculas de agua. En la HEC se propone un mecanismo denominado “la regla molecular” para seleccionar al H₂O₂. En dicho mecanismo participan cuatro moléculas de agua localizadas en el lado distal del sitio activo. Las cuatro moléculas de agua están confinadas por las cadenas laterales de los aminoácidos hidrofóbicos Val74, Val116, Pro129, Phe153, Phe154 y Trp168 que conforman un canal muy estrecho (2-3 Å), permitiendo que sólo el agua, el H₂O₂ y moléculas pequeñas (como metanol, etanol, ácido nítrico y fórmico) lleguen al hemo. En la Fig. 4 se observan las moléculas de agua W1-W3 y W6-W8 que forman parte del canal principal, W4 y W5 están cercanas a los propionatos del hemo. W1-W3 y W6 son las cuatro moléculas de agua propuestas en el mecanismo de “la regla molecular”. También se muestran algunos aminoácidos del

canal hidrofóbico en la HEC (4). En las catalasas está descrito un segundo canal que llega al sitio activo, denominado canal menor (30 Å de largo). El canal principal y el canal menor sugieren un modelo en el cual un canal sería usado para la llegada del sustrato y el otro para la salida de los productos (11). Dichos canales evitarían la interferencia del sustrato y los productos y podría explicar el número de recambio tan elevado en las catalasas de 10⁵ a 10⁶ por segundo.

Las catalasas BLC, PMC, MLC, SCCA y HEC tienen como grupo prostético un hemo *b* (Fe protoporfirina IX) (Fig. 3A) (1, 4, 8, 9, 13, 14). En cambio las catalasas PVC y HPII tienen la configuración de un hemo modificado, llamado hemo *d*, con una *cis*-hidroxi- γ -espirolactona en el anillo pirrólico III (Fig. 3B). El hemo *d* es el resultado de la 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* (15, 16, 19). La PVC y la HPII tienen casi exclusivamente hemo *d* y en ciertos casos una pequeña fracción de hemo *b*. En el caso de la CAT-1 se encontró una mezcla de hemo *b* (57%) y hemo *d* (43%) (Díaz A, Rudiño-Piñeira E, Arreola R, Horjales E y Hansberg W. Manuscrito en preparación). La BLC nativa aislada tiene 50% de su hemo como biliverdina y bilirrubina, que son productos de la degradación oxidativa del hemo (19).

La mutante N201H de la HPII tiene hemo *b* con la misma orientación que en la enzima nativa. Lo anterior indica que el hemo *b* no se modifica a hemo *d* *in vivo* por un sistema especializado previo a la inserción del hemo en la enzima. El hemo *b* se une al sitio activo de la enzima en donde se convierte en hemo *d* en los primeros ciclos catalíticos. Se ha observado la conversión del hemo *b* en hemo *d* en presencia del

H₂O₂ en la mutante N201H (7). Existen otras mutantes (V169C, H392Q, H392A) de la HPII que tienen hemo *b*. La mutante 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 substitución de los aminoácidos que interactúan con el hemo, la Gln 419 y la Ser 414, también afecta a la proporción *cis:trans* de la espirolactona en el hemo *d* (6).

Se ha reportado que la CAT-1 se modifica durante su almacenamiento aumentando su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes. Actualmente se sabe que dicha modificación se debe al oxígeno en singulete. La oxidación tiene lugar en el hemo y también ocurre durante la diferenciación del hongo y en condiciones de tensión metabólica. No se sabe exactamente en qué consiste la modificación de la CAT-1 por el oxígeno, pero posiblemente el oxígeno sea el responsable de la dihidroxilación del hemo que da origen al hemo *d* (2). 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). El espectro de absorción del hemo de la CAT-1e es más asimétrico que el de la CAT-1a (2). La modificación por el oxígeno no afecta a la actividad de la enzima. La CAT-1e tiene una k_{cat} y una eficiencia catalítica $k_{\text{cat}}/K_m(\text{H}_2\text{O}_2)$ similares a la CAT-1a. Sin embargo, comparada con la CAT-1a, la CAT-1e es más susceptible a la inhibición reversible por cianuro, es más susceptible a la degradación por subtilisina y la reacción catalizada tiene una mayor energía de activación (Díaz A, Muñoz-Clares R A y Hansberg W; Díaz A, Muñoz-Clares R A, Rangel, P y Hansberg W. Manuscritos en preparación). Es probable que la modifica-

ción de la CAT-1 por el oxígeno sea una señal para su degradación.

La diferencia importante en el grupo hemo de las catalasas grandes respecto de las pequeñas es que las grandes tienen un hemo modificado ó hemo *d*. El oxígeno podría ser la especie que dihidroxila el anillo III del hemo de la HPII, de la PVC y de la CAT-1 para formar el hemo *d* con la espirolactona, lo cual no se ha observado en ninguna catalasa pequeña. La modificación del hemo en las catalasas grandes no afecta a su actividad, pero probablemente sí a su recambio (2). Posiblemente no exista una relación entre la modificación del hemo y la resistencia a la inhibición e inactivación por sustrato.

EL NADPH

Las catalasas pequeñas SCCA, BLC, MLC, PMC y HEC tienen un sitio de unión para el NADPH por cada subunidad que 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 que unen ese dinucleótido (4, 9). El anillo de la adenina del NADPH está en una pequeña cavidad conformada por varios aminoácidos hidrofóbicos (Ile177, Leu428 y Leu429 en PMC). El grupo 2' fosfato de la adenina ribosa interactúa con la cadena lateral de una arginina conservada (Arg182 en PMC). Una histidina (His284 en PMC) interactúa con el grupo pirofosfato y la nicotidamina (9). La unión del nucleótido en la BLC y en la PMC es muy fuerte (constante de disociación, K_D , < 5 nM). La SCCA no une al NADPH tan fuertemente (K_D < 2 μM), ya que tiene una Gln301 en lugar de la histidina que interactúa con el dinucleótido. Otras catalasas con baja afinidad por el NADPH son las de plantas, que presentan un ácido glutámico en la posición de la histidina (1, 4). En la estructura de la CatF, que está relacionada filogenéticamente con las catala-

sas de las plantas, no se encontró la molécula de NADPH y los aminoácidos que participan en la unión del nucleótido están cambiados (12).

En la HEC se ha observado que sólo dos subunidades tienen el NADPH y dos carecen del dinucleótido, lo cual permite examinar la conformación del sitio de unión sin el NADPH. La Phe198, la Val450 y la His305, que interacciona con el pirofosfato, son los aminoácidos que tienen cambios conformacionales al unirse el NADPH. Los cambios conformacionales en la HEC son mayores que los observados en la PMC, otra catalasa para la cual se cuenta con las estructuras con y sin el NADPH (4, 9).

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 inactivan a la enzima. Las catalasas grandes no unen al NADPH pero tampoco tienden a formar los compuestos II y III, aunque no se conoce la razón por la cual no se inactivan por sustrato. Se han propuesto dos rutas de transferencia de electrones del NADPH al hemo en la PMC. En la ruta más corta el movimiento del electrón sería nicotinamida (C4)→Pro130→Ser196. El hecho de que este último aminoácido tenga ángulos dihedros desfavorables en la cadena principal podría tener que ver con la transferencia de electrones (16).

En un estudio con dos mutantes de PMC, la F194Y y la F215Y, se muestra que en las catalasas existen dos mecanismos en la reacción con nucleótidos: uno "directo", por el cual el nucleótido reduce el compuesto I en una reacción de dos electrones, y un segundo mecanismo "disparado por un radical", el cual involucra un radical tirosilo en un proceso de transferencia de un electrón (ó dos reacciones secuenciales de un electrón) (20).

ENLACES COVALENTES INUSUALES

En la estructura cristalográfica de la catalasa HP_{II} de *E. coli* a una resolución de 1.9 Å se encontró un enlace covalente inusual entre la His392 y la Tyr415 que se coordina con el Fe^{III} del hemo (11). El enlace es entre el Nδ del imidazol de la His392 y el Cβ de la Tyr415 (Fig. 5A). La distancia de este enlace es de 1.6 Å y está conservado en las cuatro subunidades de la HP_{II}. Esta distancia es la que se espera para un enlace C-N (1.48 Å). Los mapas de densidad electrónica muestran una clara conexión entre la His y la Tyr y tienen una densidad electrónica tan marcada como la encontrada en los enlaces covalentes de la cadena principal. Dicho enlace covalente se confirmó por un análisis de espectrometría de masas de los péptidos obtenidos con una digestión con tripsina. En contraste, las dos mutantes inactivas H128A y H128N no presentan el enlace covalente His-Tyr y el hemo *d*, por lo cual se propuso inicialmente que la reacción de la formación del enlace His-Tyr y la modificación del hemo están acopladas (21). Si embargo, la mutante N201H presenta el enlace His-Tyr y el hemo *b*, lo que sugiere que las dos reacciones están desacopladas. Tanto la modificación del hemo *b* como la formación del enlace covalente His-Tyr parecen necesitar de la actividad catalítica. Se ha propuesto que el compuesto I actúa como iniciador de estas reacciones (7). En particular, para la formación del enlace covalente, además del compuesto I, se propone que también se forman radicales libres que dan lugar a un reacondo de electrones (21).

La CAT-1 de *N. crassa* a una resolución de 1.75 Å presenta un enlace covalente equivalente al de la HP_{II}. En este caso, el enlace es entre el azufre de la Cys356 y el Cβ de la Tyr379 que coordina el Fe del hemo (Fig. 5B). La densidad electrónica y la distancia de enlace de 1.9 Å apoyan la

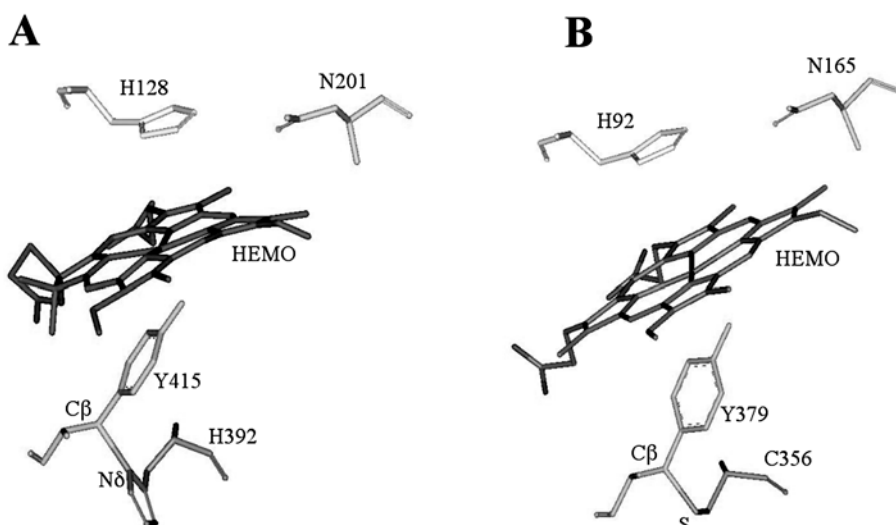


Figura 5. A. El enlace covalente inusual en la catalasa HP_{II} de *E. coli* entre el Nd de la H392 y el Cβ de la Y415 que coordina al Fe del hemo. B. El enlace covalente inusual en la CAT-1 de *N. crassa* entre el S de la C356 y el Cβ de la Y379 esencial.

existencia de este enlace covalente Cys-Tyr (Díaz A, Rudiño-Piñera E, Arreola R, Horjales E y Hansberg W. Manuscrito en preparación).

En la mutante V169C de la HP_{II} se ha descrito un enlace covalente inusual entre el azufre de la Cys169 y el Cε del anillo imidazol de la His128 esencial. La distancia del enlace es de 1.87 Å, consistente con un enlace covalente, y tiene la densidad electrónica adecuada. El péptido resultante se detectó con un análisis de espectrometría de masas de una digestión con tripsina. Este enlace Cys-His no es equivalente al de la HP_{II} nativa o al de la CAT-1, ya que se encuentra en el lado distal del hemo y la tirosina esencial no participa en él (6).

La presencia de los enlaces covalentes inusuales parecen ser exclusivos de las catalasas grandes, pues no se ha observado en las estructuras de las catalasas pequeñas. El enlace His-Tyr en la HP_{II} no participa en la resistencia de la enzima a la desnaturización, ya que una mutante sin el enlace covalente es igual de resistente a la desnaturización que la enzima nativa (17). La presencia del enlace His-Tyr en la HP_{II} debe introducir cierta rigidez en el sitio activo de la

HP_{II} y podría facilitar el movimiento de electrones en una región grande (21). Las catalasas grandes no unen NADPH pero difícilmente forman los compuestos II y III inactivos (5). Los enlaces covalentes inusuales de la HP_{II} y de la CAT-1 podrían proporcionar un mecanismo alternativo para evitar la formación de los compuestos II y III. Sin embargo, no hay evidencia experimental de cuál es la función de dichos enlaces covalentes.

Las catalasas no son las únicas hemoproteínas que tienen enlaces covalentes inusuales. La citocromo *c* oxidasa bovina, determinada a 2.3 Å de resolución, presenta un enlace covalente en el sitio activo entre el Ne del grupo imidazol de la His240 y el Cε del grupo fenol de la Tyr244. La Tyr244 acidificada por el enlace covalente del nitrógeno del imidazol es un posible donador de protones para la reducción del O₂ por la enzima (22).

La catalasa-peroxidasa de *Haloarcula marismortui*, determinada a 2.0 Å de resolución, es otro ejemplo de enlaces covalentes inusuales. Esta enzima tiene dos enlaces covalentes entre las cadenas laterales de tres aminoácidos que están cercanos al sitio activo. En este caso el enlace es entre el Cε1 de la Tyr218 y el


C η 2 del Trp95, y entre el C ϵ 2 de la Tyr218 y el S δ de la Met244. Las distancias entre los átomos unidos son 1.68 Å en Tyr218-Trp95 y 1.72 Å en Trp95-Met244. Los enlaces covalentes fijan dos asas grandes en la superficie de la enzima que cubre el canal de acceso del sustrato al sitio activo. Estos enlaces covalentes pueden ser importantes para la actividad de catalasa de esta catalasa-peroxidasa. Sólo la actividad de catalasa y no la de peroxidasa se pierde cuando se muta el Trp95. Se está investigando el papel funcional de estos enlaces covalentes (23).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las catalasas tienen una organización tridimensional única y muy conservada. Los monómeros se entrelazan para formar dímeros unidos fuertemente en el tetrámero, lo cual hace que las catalasas sean enzimas muy resistentes y estables. Sin embargo, existen diferen-

cias estructurales y funcionales entre ellas. Una diferencia es la presencia en las catalasas grandes del dominio C-terminal semejante a la flavodoxina, cuya función se desconoce. En cambio, las catalasas pequeñas tienen un sitio de unión para el NADPH que funcionaría como una molécula donadora de electrones evitando la formación de los compuestos inactivos II y III. Las catalasas grandes son más resistentes a la desnaturalización y a la inhibición e inactivación por sustrato que las catalasas pequeñas. Otra diferencia es que las catalasas grandes como la HPII, PVC y la CAT-1 tienen un hemo modificado o hemo *d* y las catalasas pequeñas presentan hemo *b*. El hemo *d* aunque está oxidado no pierde su función. Finalmente las catalasas grandes como la HPII y la CAT-1 presentan enlaces covalentes inusuales que involucran la Tyr que coordina al Fe del hemo y cuya función se desco-

noce. Las catalasas grandes difícilmente forman los compuestos II y III inactivos a pesar de que no unen NADPH, por lo cual se propone que una posible función de los enlaces covalentes inusuales, sería evitar la formación de los compuestos inactivos.

Finalmente, es necesario obtener información estructural y cinética de proteínas con mutaciones específicas para contestar las preguntas pendientes sobre las catalasas, tales como: ¿Cuál es la función del dominio C-terminal en las catalasas grandes? ¿Por qué las catalasas grandes no forman los compuestos II y III inactivos? ¿Cuál es la función de los enlaces covalentes inusuales en las catalasas grandes? ¿Cuál es el papel funcional de la inversión del hemo? 

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Wilhelm Hansberg la revisión de este artículo.

REFERENCIAS

1. 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.
2. Lledías F, Rangel P y Hansberg W (1998) Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem* 273:10630-10637.
3. Murshudov GN, Grebenko AI, Brannigan JA, Anston AA, Barynin VV, Dodson GG, Dauter Z, Wilson KS y Melik-Adamyán WR. (2002) The structures of *Micrococcus lysodeikticus* catalase, its ferryl intermediate (compound II) and NADPH complex. *Acta Cryst D* 58:1972-1082.
4. Putman CD, Arvail 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.
5. Lardinois OM, Mestdagh M y Rouxhet PG (1996) Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1295:222-238.
6. 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.
7. Melik-Adamyán 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.
8. Murshudov GN, Melik-Adamyán 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 Letters* 312:127-131.

9. 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.
10. 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.
11. Bravo J, Maté MJ, Scheneider 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.
12. Carpena X, Soriano M, Klotz MG, Duckworth HW, Donald LJ, Melik-Adamyany 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.
13. Murthy MRN, Reid TJ, Sicignano A, Tanaka N y Rossmann MG (1981) Structure of beef liver catalase. *J Mol Biol* 152:465-499.
14. Fita I, Silva AM, Murthy MRN y Rossmann MG (1986) The refined structure of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr D* 42:497-515.
15. Vainshtein BK, Melik-Adamyany 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.
16. Bravo J, Fita I, Gouet P, Jouve HM, Melik-Adamyany 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.
17. Switala J, O'Neil JO y Loewen PC (1999) Catalase HPII from *Escherichia coli* exhibits enhanced resistance to denaturation. *Biochemistry* 38:3895-3901.
18. Díaz A, Rangel P, Montes de Oca Y, Lledías F y Hansberg W (2001) Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Radic Biol Med* 31:1323-1333.
19. Murshudov GN, Grebenko AI, Barynin V, Dauter Z, Wilson KS, Vainshtein VK, Melik-Adamyany WR, 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.
20. Andreoletti P, Gambarelli S, Sainz G, Stojanoff V, White C, Desfonds G, Gagnon J, Gaillard J y Jouve MH (2001) Formation of a tyrosyl radical intermediate in *Proteus mirabilis* catalase by directed mutagenesis and consequences for nucleotide reactivity. *Biochemistry* 40:13734-13743.
21. 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.
22. Yoshikawa S, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yamashita E, Inoue N, Yao M, Fei MJ, Libeu CP, Mizushima T, Yamaguchi H, Tomizaki T y Tsukihara T (1998) Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase. *Science* 280:1723-1729.
23. Yamada Y, Fujiwara T, Sato T, Igarashi N y Tanaka N (2002) The 2.0 Å crystal structure of catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. *Nature Structural Biology* 9:691-695.