

INACTIVACION SUICIDA DE LA CLOROPEROXIDASA DE *CALDARIOMYCES FUMAGO*

Marcela Ayala Aceves, Rosa Román Miranda, Rafael Vázquez Duhalt. Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001 CP 62210. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Mor. Fax (777)3172388. maa@ibt.unam.mx

Palabras clave: cloroperoxidasa, inactivación, peróxido, potencial redox

Introducción. Las peroxidases se inactivan en presencia de peróxido, que actúa como aceptor final de electrones en las reacciones de oxidoreducción catalizadas por estas enzimas. El mecanismo de inactivación involucra a los intermediarios enzimáticos (Compuesto I, II y III) que se forman entre el peróxido y la enzima durante el recambio de ésta; por este motivo, la inactivación se denomina inactivación suicida (1). La inestabilidad de las peroxidases ante el peróxido es uno de los obstáculos para desarrollar aplicaciones a gran escala con estas enzimas. Ampliar el conocimiento sobre el mecanismo de inactivación puede ayudar a diseñar enzimas más estables. En este trabajo se estudian los cambios moleculares que ocurren durante la inactivación por peróxido de la cloroperoxidasa (CPO) de *C. fumago*, una de las peroxidases más versátiles que se conocen (2).

Metodología. La cloroperoxidasa parcial o totalmente inactivada por peróxido a pH 6 fue analizada utilizando diferentes procedimientos. Fue hidrolizada con tripsina y los péptidos analizados por espectrometría de masas para determinar cambios en residuos de Trp. También se midieron los cambios en la fluorescencia debido a Trp. Además se analizó la composición de aminoácidos y estructura tridimensional de las muestras por dicroísmo circular.

Resultados y discusión. La pérdida de actividad de la CPO en presencia de peróxido a pH 6 es concomitante con la pérdida de absorbancia del grupo hemo (Figura 1).

Se encontró que la estructura tridimensional de la enzima se mantiene prácticamente intacta durante la inactivación por peróxido. Se observó que la fluorescencia por Trp se reduce en un 20% en la CPO inactiva (Fig. 1). Sin embargo, se encontró que los 5 residuos Trp que contiene la cloroperoxidasa son parcialmente oxidados durante la inactivación, por lo que no se puede concluir que son responsables por la pérdida de actividad. Por otro lado, no se detectaron cambios importantes en la composición de la enzima inactiva (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de la CPO inactivada por peróxido

Residuo	Contenido inactiva / nativa
Asx	0.97
Ser	0.98
Glx	0.96
Gly	0.98
His	0.9
Arg	1.01
Thr	0.86
Ala	0.93
Pro	1.04
Val	1.11
Met	0.71
Lys	0.84
Ile	1.03
Leu	1.03
Phe	1.13
Tyr	-
Cys	-
Trp	-

ND. No detectado.

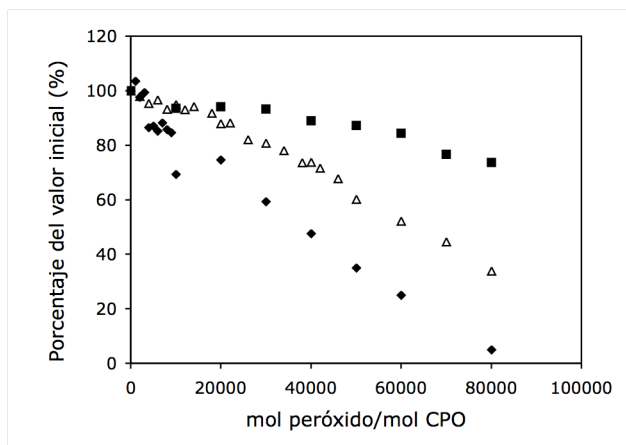


Figura 1. Cambios en fluorescencia de Trp (■), señal del Soret (△) y actividad de la CPO (◆) durante la inactivación con peróxido

Tampoco hay evidencia de entrecruzamiento por oxidación de tirosinas, como se ha observado para otras hemoproteínas (1).

Conclusiones. Los resultados sugieren que el mecanismo de inactivación de la CPO de *C. fumago* consiste principalmente en la destrucción oxidativa del grupo hemo.

Agradecimientos. A la Dra. Lucía Perezgasga y a la Unidad de Proteómica del IBT por su apoyo técnico. Al financiamiento de Conacyt, proyecto 56718.

Bibliografía.

- (1) Valderrama B, Ayala M, Vazquez-Duhalt R (2002) Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chem Biol.* 9: 555-65. (2) Hofrichter M, Ulrich R (2006) Heme-thiolate haloperoxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 276-88