

INGENIERÍA MOLECULAR EN CITOCROMO *c* DE *Saccharomyces cerevisiae* PARA EL INCREMENTO DE SU CAPACIDAD DE OXIDACIÓN DE GUAYACOL.

Alexis Rodríguez, Raunel Tinoco y Rafael Vazquez-Duhalt.

Instituto de Biotecnología-UNAM, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. C.P. 62210. Fax: 777-3172388. Correo electrónico: alexisrs@ibt.unam.mx.

Palabras clave: Citocromo *c*, Fenoles, Guayacol, Oxidación.

Introducción: Las peroxidadasas se encuentran en diferentes microorganismos, plantas y animales. La actividad de las peroxidadasas se puede medir mediante un ensayo colorimétrico utilizando guayacol, este ensayo se basa en el cambio de absorbancia a 470 nm [1]. El producto de la reacción de oxidación del guayacol mediada por peroxidadasas en presencia de H₂O₂ se ha descrito como tetraguayacol (Fig. 1). En el presente trabajo comparamos la actividad catalítica de 8 variantes de citocromo *c* (proteína con actividad peroxidada) en la oxidación de guayacol.

El objetivo de este trabajo es comparar las eficiencias catalíticas entre las 8 variantes ensayadas. La descripción de las variantes se presenta en el Cuadro 1.

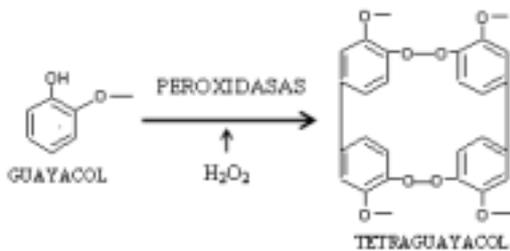


Figura 1. Producto de reacción de la oxidación de guayacol por peroxidadasas.

Metodología: La producción de proteínas recombinantes se realizó en jarras de fermentación de 10 L y se purificaron de acuerdo a lo reportado [2]. Se determinó la actividad específica de los citocromos en la oxidación de guayacol en una mezcla de reacción que contenía 16 mM de guayacol en buffer fosfatos (60 mM/pH 6.1), midiendo el aumento de absorbancia a 470 nm en un espectrofotómetro BECKMAN DU 650. Las reacciones se iniciaron agregando 4 mM de H₂O₂ y se tomo como control la ausencia de proteína. La actividad específica se determinó midiendo las moles de tetraguayacol producidas, utilizando un coeficiente de extinción molar de 26.6 mM⁻¹ cm⁻¹ [3].

Resultados y discusión: Como se observa en la figura 2 las variantes M5 y M2 presentan aproximadamente 45 veces la actividad catalítica de la proteína nativa (tomando en cuenta el error experimental). Los residuos N52I y Y67F son comunes en la mayoría de las variantes por lo que no se pueden tomar como responsables del aumento en la actividad, sin embargo mutaciones puntuales M80I y K79A podrían haber alterado la conformación del grupo hemoprostético, debido a que tanto la metionina 80 y la lisina 79 interactúan con este. Al eliminar estos residuos potencialmente donadores de electrones (Lisina, NH₃⁺) se favorece la oxidación de guayacol debido a que los radicales formados

reducen su ataque a la proteína y favorecen el ataque hacia el sustrato. Otra posible explicación a estos resultados resulta del aumento de espacio (Metionina) dentro de la cavidad del grupo prostético favoreciendo la entrada de los sustratos y el agua. Con la finalidad de comprobar estas hipótesis se está realizando el análisis de modelos estructurales de las mutantes.

Cuadro 1. Variantes de citocromo *c* ensayadas.

Citocromos <i>c</i>	Mutaciones
Cyt Scc	Nativo
Cyt WT16	(T-5A, C102T)
Cyt M1	(T-5A, C102T, N52I, Y67F)
Cyt M2	(T-5A, C102T, N52I, Y67F, M80A)
Cyt M3	(T-5A, C102T, N52I, W59F, Y67F, M80D)
Cyt M4	(T-5A, C102T, N52I, W59F, Y67F, F82G)
Cyt M5	(T-5A, C102T, N52I, W59F, Y67K, K79A)
Cyt B102	(T-5A, C102T, N52I, W59F, Y67F, K79F, F82G)

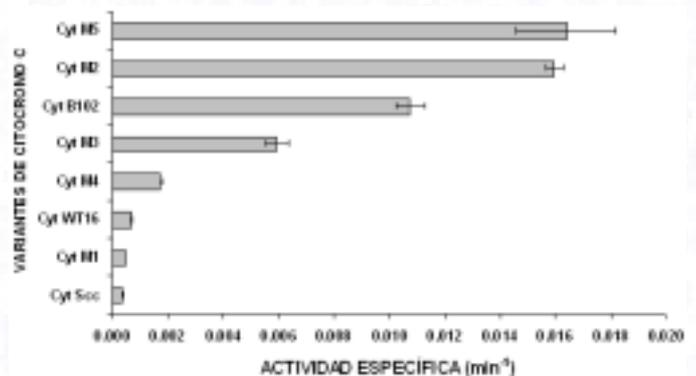


Figura 2. Actividad de los citocromos *c* en la oxidación de guayacol.

Conclusiones: El cambio de residuos potencialmente donadores de electrones cercanos al grupo prostético aumenta la capacidad de las variantes para la oxidación del guayacol en aproximadamente 45 veces en el caso de las mutantes M2 y M5.

Bibliografía:

- Doerge, D. R., Divi, R. L., y Churchwell, M. I., (1997). Identification of the Colored Guaiacol Oxidation Product Produced by Peroxidases. *Anal. Biochem.* 250:10-17.
- García-Arellano, H. Valderrama, B. Saab-Rincón G. y Vazquez-Duhalt, R., (2000). High temperature biocatalysis by chemically modified cytochrome *c*. *Bioconj. Chem.* 13: 1336-1344.
- Chance, B. y Maehly, A.C., (1995). Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* 2:764-775.