



ESTUDIOS SOBRE LA AUTOINACTIVACION DE LA PEROXIDASA DE *B. ADUSTA*

Marcela Ayala, Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca 62250 Morelos maa@ibt.unam.mx

Palabras clave: peroxidasa, inactivación, radical libre.

Introducción. El mecanismo catalítico de las peroxidasas involucra la transferencia de electrones desde el sustrato hacia el grupo hemo. Recientemente se han descrito peroxidasas que presentan sitios activos alternos, tales como radicales libres centrados en residuos superficiales. Una de estas enzimas, la peroxidasa versátil (PV) de *Bjerkandera adusta*, es capaz de catalizar la oxidación de sustratos a través de la formación de Mn(III) (actividad Mn-dependiente) y también de sustratos que no tienen acceso al grupo hemo (actividad Mn-independiente). Este segundo mecanismo involucra un radical basado en el Trp 164 que se encuentra en la superficie (1). Como todas las peroxidasas, la PV se inactiva en presencia de su sustrato H_2O_2 (2). El objetivo de este trabajo es estudiar a nivel molecular el mecanismo de inactivación de PV, considerando las dos rutas catalíticas y por tanto dos sitios posibles de autoinactivación: el grupo hemo y el Trp 164 en la superficie.

Metodología. La PV se produjo en un medio sólido con avena y se purificó hasta un $R_z=3.3$, lo que corresponde a una pureza electroforética de al menos 90%. La inactivación de la enzima en presencia de H_2O_2 a pH 4.5 y 3 se caracterizó midiendo la señal del hemo (A_{407nm}), actividad Mn-dependiente e independiente, así como el contenido de aminoácidos y de estructura secundaria.

Resultados y discusión. La PV tiene dos actividades peroxidáticas, con diferente pH óptimo y especificidad y que ocurren en diferentes sitios, como se muestra en la Fig. 1. La actividad Mn-dependiente tiene un pH óptimo= 4.5 y depende principalmente de la integridad del hemo; la actividad Mn-independiente tiene un pH óptimo=3 y depende además de la integridad del Trp 164.

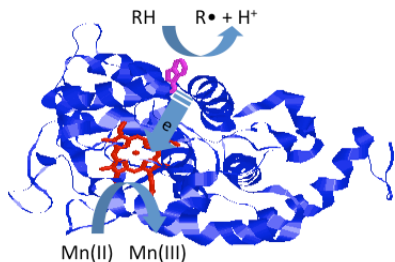


Fig 1. Estructura de la PV mostrando los dos tipos de reacciones que la enzima puede catalizar en sitios activos alternos

En la Fig. 2 se muestra el perfil de inactivación de la PV a pH 4.5. La actividad Mn-independiente se abate con bajas cantidades de H_2O_2 (10X), mientras que la señal del hemo y la actividad Mn-dependiente se conservan.

Por otro lado, a pH 3 ambas actividades se pierden rápidamente, al igual que la señal del Soret.

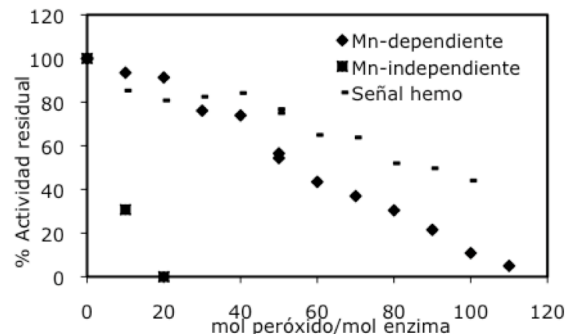


Fig. 2. Perfil de inactivación de PV a pH 4.5 en presencia de H_2O_2

El dicroísmo circular muestra que a pH 4.5 y bajas cantidades de H_2O_2 (10X molar, sobre la enzima) la estructura secundaria se mantiene prácticamente sin cambio. Por otro lado, cuando se añade mayor cantidad de H_2O_2 (70X molar, sobre la enzima), se observa un cambio drástico, perdiéndose un 50% de α -hélice. El contenido de aminoácidos es similar en PV nativa y PV 10X, mientras que en PV 70X el cambio más importantes es una reducción del 50% de His.

Conclusiones. Los resultados sugieren que el Trp 164 es susceptible a oxidarse y durante el proceso de autoinactivación se necesita una baja concentración de H_2O_2 para abatir la actividad Mn-independiente, conservándose la estructura y el grupo hemo. Por otro lado, a mayores concentraciones de H_2O_2 se detecta la pérdida total de actividad, la destrucción del hemo y la pérdida de His. Las His son importantes para la actividad, puesto que el grupo hemo se encuentra unido a la proteína por un enlace de coordinación con una His; además, el residuo catalítico que participa en la activación del H_2O_2 es también una His. Por tanto, es posible que una pérdida de coordinación del hemo por oxidación de histidinas y del anillo porfirínico induzcan la pérdida de estructura y actividad.

Agradecimiento. Al financiamiento de Conacyt 56718.

Bibliografía 1. Ayala Aceves M, Baratto MC, Basosi R, Vazquez-Duhalte R, Pogni R. Spectroscopic characterization of a Mn-Li peroxidase hybrid isozyme produced by *B. adusta* in the absence of manganese: evidence of a protein centered radical by H_2O_2 (2001) *J Mol Catal B Enzym* 16:159-167. 2. Valderrama B, Ayala M, Vazquez-Duhalte R. Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. (2002) *Chem Biol*. 9:555-565