



00551
10
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
Zaj

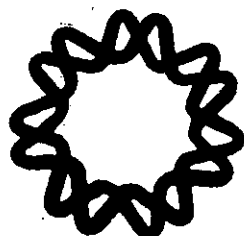
**ESTUDIO DEL MECANISMO DE INACTIVACION
DEL CITOCROMO C POR ACCION DEL
PEROXIDO DE HIDROGENO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A :

VILLEGAS SANCHEZ JOSE ANTONIO



273288
CUERNAVACA, MORELOS

1999.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**ESTUDIO DEL MECANISMO DE INACTIVACION
DEL CITOCROMO C POR ACCION DEL
PEROXIDO DE HIDROGENO**

T E S I S
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
P R E S E N T A :**
VILLEGAS SANCHEZ JOSE ANTONIO.

Cuernavaca, Morelos

1999

Agradecimientos

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo así como por su valiosa tutela en todos los aspectos relacionados con mi formación.

A Raunel Tinoco por su amistad y su constante ayuda en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos: Mónica, Eduardo, Humberto, Marcela, Juan y Rosa por contribuir a que mi estancia en el laboratorio fuera tan placentera.

A los doctores, Juan Miranda, Gabriel Moreno, Federico Rosell, Mark Brown, Grant Mauk, Mario Soberón, Agustín Lopez y Brenda Valderrama por su enorme ayuda en la realización de esta tesis.

Dedicatoria

A mis padres por su afecto y apoyo incondicional.

A mi hermano por su amistad y consejos.

A Adriana por su amor y comprensión.

A mi querida abuela por su cariño y dedicación.

Resumen

En trabajos anteriores realizados en el laboratorio del Dr. Rafael Vázquez Duhalt, se ha demostrado la capacidad del citocromo c de catalizar la oxidación de hidrocarburos polinucleoaromáticos en presencia de peróxido de hidrógeno. Esta clase de hidrocarburos constituyen un grave problema ambiental debido a su potencial tóxico, carcinogénico y mutagénico.

Se ha planteado que el mecanismo mediante el cual el citocromo logra esta oxidación es similar al de las peroxidases, y al igual que estas enzimas, sufre una reacción de inactivación por efecto de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, hasta la fecha no se han logrado establecer los productos de dicha inactivación ni el mecanismo mediante el cual se producen. Esta inestabilidad al peróxido de hidrógeno limita la utilización de esta proteína, de la misma manera que como sería el caso de cualquier otra enzima con tiempos de vida cortos.

En este trabajo se planteó estudiar la inactivación que sufre el citocromo c de levadura cuando reacciona con peróxido de hidrógeno, siguiendo dos estrategias distintas. Por una parte se propuso determinar los metabolitos derivados de la reacción de inactivación con el fin de poder inferir el mecanismo, mientras que por otra, se determinó la estabilidad de distintas variantes de citocromo c de levadura con el fin de relacionar sus características estructurales, obtenidas por simulación, con sus propiedades de estabilidad. De acuerdo a los resultados que se obtuvieron, se llegó a las siguientes conclusiones.

El iso-1-citocromo c de levadura se inactiva de manera similar a otras hemoproteínas como las peroxidases, en presencia de peróxido de hidrógeno. Esta inactivación se ve acompañada por una destrucción del grupo hemo de la proteína. La reacción aparentemente no produce compuestos del tipo de las biliverdinas, cosa que sucede con el grupo hemo *in vivo*.

De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible afirmar que este citocromo se inactiva debido a una oxidación de un residuo esencial para la catálisis, y que este proceso precede a la destrucción del grupo hemo, y no viceversa, como se había planteado en un principio.

Se demostró asimismo que mutaciones puntuales N52I, e Y67F, incrementan la estabilidad de la proteína hacia la acción del peróxido de hidrógeno. Además, las mutaciones N52I/Y67F/C102T, produjeron una variante en donde el grupo prostético no se ve afectado por la presencia de peróxido, aún cuando pierde su actividad catalítica. Esto confirma en gran medida, que la inactivación y la destrucción del hemo son procesos distintos.

Finalmente, el tener una variante en la cual la destrucción del grupo hemo ha sido reducida de manera significativa es un paso muy importante para el estudio del proceso de inactivación de esta proteína.

Tabla de contenido

Introducción

• Hemoproteínas	1
Estado de coordinación del átomo de hierro	4
Función y grupo prostético	4
• Hemoproteínas como biocatalizadores	5
Peroxidasas	5
<u>Lignino peroxidasa</u>	8
<u>Manganeso peroxidasa</u>	8
Citocromo P450	9
Mioglobina y globinas	12
• Citocromos	12
Citocromo c como biocatalizador	14
• Estabilidad química de proteínas	15
Desamidación de asparagina	15
Degradación de puentes disulfuro	16
Glicosilación	16

Oxidación de proteínas	16
Objetivos	
• <i>Objetivo general</i>	18
• <i>Objetivos particulares</i>	18
Materiales y Métodos	
• <i>Soluciones y medios de cultivo</i>	19
• <i>Reactivos y materiales</i>	19
• <i>Metodos</i>	
Identificación de productos de oxidación	20
Construcción de mutantes de citocromo c	20
Producción y purificación de proteína mutante	25
Caracterización de proteína mutante	26
Determinación del contenido de hierro de la proteína oxidada	27
Resultados	28
Discusión	39
Conclusiones	45
Perspectivas	46
Referencias	47

Índice de figuras y tablas

Introducción

Figura 1 Grupo Hemo.	1
Figura 2 Grupo hemo con sus ligandos axiales.	1
Figura 3 Distintas clases de hemo.	2
Figura 4 Distintas geometrías del compuesto de coordinación del hierro dependiendo del tipo de ligando.	4
Figura 5 Ciclo normal de las peroxidetasas.	7
Figura 6. Mecanismo catalítico propuesto para los citocromos P450.	11
Figura 7. Clasificación de los citocromos de acuerdo a su estado de coordinación y al tipo de ligando.	12
Figura 8. Citocromo c típico en el que se aprecian sus alfa hélices y el grupo hemo con un hierro hexacoordinado.	13
Tabla I. Distintas clases de hemo y las proteínas que lo contienen.	3
Tabla II Clasificación de hemoproteínas de acuerdo a su función.	5
Tabla III. Clasificación de las peroxidetasas dependiendo de su origen.	6
Tabla IV. Clasificación de una de las superfamilias de las peroxidetasas.	6

Métodos

Figura 9. Estrategia seguida para la obtención de mutante N52I/Y67F.	22
Figura 10. Esquema de la estrategia seguida para la construcción de la variante Y.	25

Resultados

Figura 11. Inactivación del citocromo c de levadura incubado con 1 mM de H ₂ O ₂ .	28
Figura 12. Cálculo de constante aparente de inactivación para el citocromo c. a una concentración de H ₂ O ₂ 1 mM.	28
Figura 13. Constante de inactivación aparente de citocromo c de levadura a diferentes concentraciones de H ₂ O ₂ .	29

Figura 14. Disminución de la absorbancia de la banda Soret de la proteína silvestre, en presencia de H_2O_2 .	29
Figura 15. Estrategia general utilizada para analizar los productos de oxidación del grupo hemo.	30
Figura 16. Comparación entre la actividad residual y la Absorbancia en la banda Soret del Citocromo c de levadura, al incubarlo con 1 mM de H_2O_2 .	31
Figura 17. Cambio en el contenido de aminoácidos del citocromo c después de 8 minutos de la reacción de oxidación con 1 mM de H_2O_2 .	32
Figura 18. Estabilidad de la variante Y- (sin tirosinas) a 1 mM de H_2O_2 .	33
Figura 19. Relación entre la k de inactivación aparente y la concentración de H_2O_2 para las distintas variantes analizadas.	34
Figura 20. Gel de agarosa para identificar mutante I52F67.	36
Figura 21. Cromatograma de purificación de la proteína mutante en una columna de CMC, eluida utilizando un gradiente de NaCl en buffer de fosfatos pH 5.0.	37
Figura 22. Disminución de la absorbancia de la banda Soret de la variante N52I/Y67F, en 1 mM de H_2O_2 .	38
Figura 23. Gráfica de absorbancia en la banda Soret con respecto al tiempo de distintas variantes de citocromo c, incubadas con H_2O_2 1mM.	38
Tabla V. Constantes de inactivación aparentes ($K= \text{min}^{-1}$) de distintas variantes de citocromo c.	33
Tabla VI. Valor de la pendiente de la gráfica de la constante aparente de inactivación en función de la concentración de peróxido de hidrógeno.	35
Tabla VII. Comparación entre las constantes aparentes (min^{-1}) de las proteínas silvestre y mutante N52I/Y67F.	37

Discusión

Figura 24. Mecanismo de inactivación inicialmente propuesto para el citocromo c en presencia de peróxido de hidrógeno.	41
Figura 25. Posible mecanismo de inactivación del citocromo c, considerando los resultados de este trabajo.	44
Tabla VIII. Constantes de inactivación ($k=\text{min}^{-1}$) de diferentes hemoproteínas a distintas concentraciones de H_2O_2 .	39

Introducción

Hemoproteínas

Las hemoproteínas constituyen una familia muy importante de proteínas que llevan a cabo una gran diversidad de funciones y que tienen en común un grupo prostético denominado hemo. Este grupo está conformado por cuatro heterociclos pirrólicos, cada uno de los cuales se encuentra unido a través de un puente metileno para formar un macrociclo semiplano. Dentro de esta estructura, un átomo de hierro (el metal de transición más abundante en la tierra) se coordina con los átomos de nitrógeno de cada pirrol, funcionando estos como ligantes ecuatoriales y conformando lo que se conoce también como anillo de porfirina (Fig. 1). De esta manera este variado grupo de proteínas se pueden clasificar también dentro del grupo de las metaloproteínas.

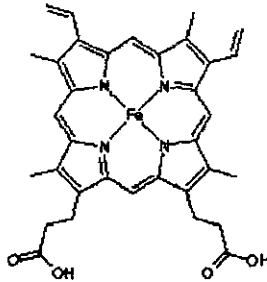


Figura 1 Grupo Hemo

Dependiendo del tipo de hemoproteína de que se trate, el grupo hemo se puede encontrar unido covalentemente a la cadena polipeptídica o mediante interacciones de coordinación con los grupos laterales de algunos aminoácidos. Independientemente de esto, el átomo de hierro dentro del grupo hemo tiene la capacidad de interactuar con otros dos ligantes para obtener un hierro hexacoordinado (Fig. 2).

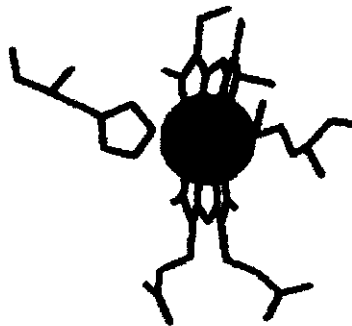


Figura 2. Vista lateral del grupo hemo con sus ligantes axiales coordinados al átomo de hierro (esfera central). A la izquierda una histidina, y a la derecha una metionina.

Existen en total 8 posiciones libres en los anillos pirrólicos las cuales pueden ser ocupadas por distintos grupos funcionales, desde metilos hasta grupos propionato. De acuerdo a la naturaleza y a la posición de estos sustituyentes se pueden encontrar diversas clases de hemo (Fig. 3).

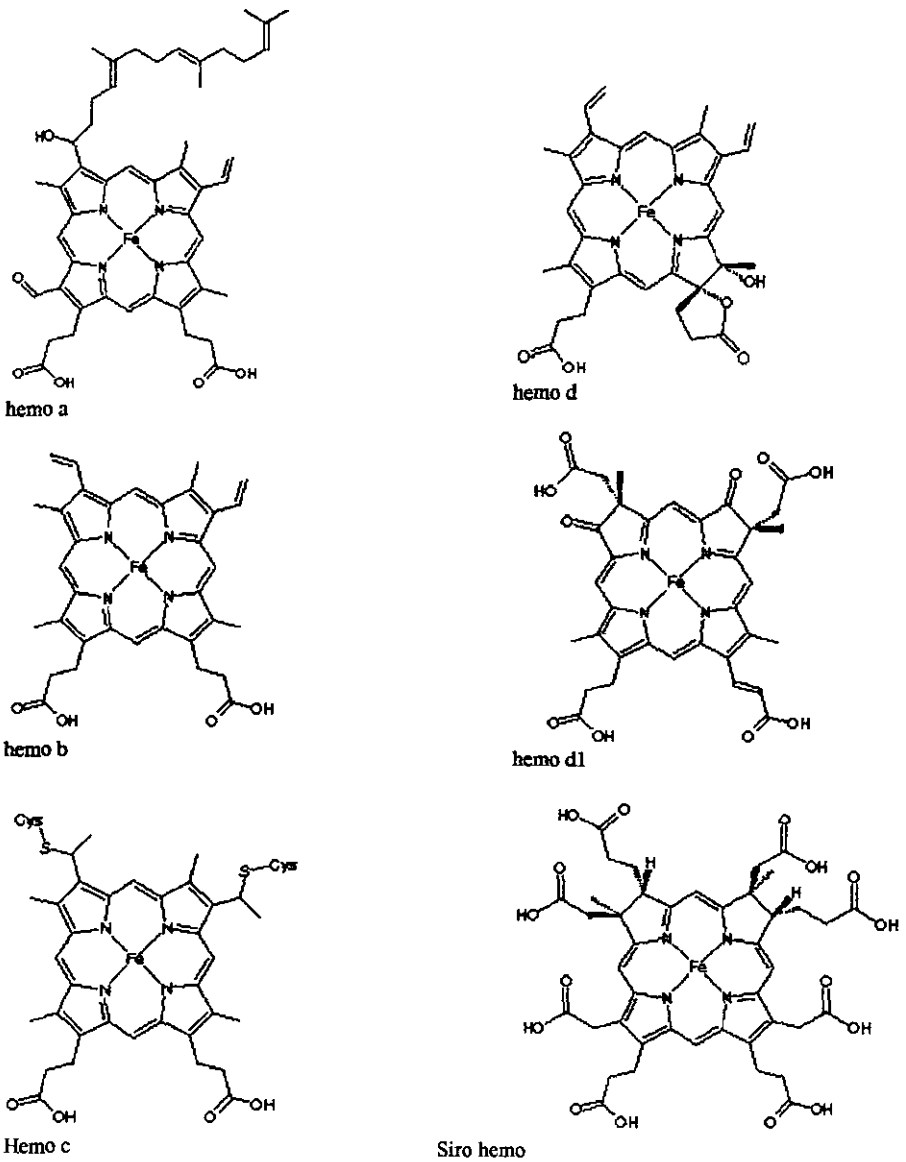
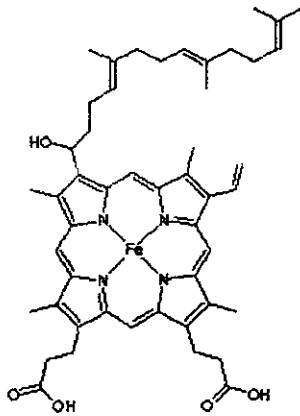
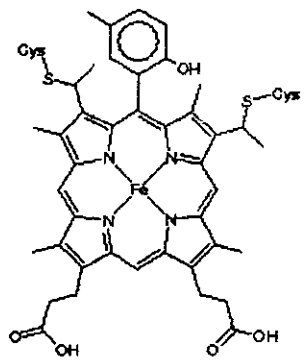


Figura 3 Distintas clases de hemo



Hemo o



Hemo p460

Figura 3 (cont.) Distintas clases de hemo

Estas estructuras diferentes, pueden usarse para clasificar a las hemoproteínas en diversos grupos, de acuerdo a la clase de hemo que contengan:

Tabla I. Distintas clases de hemo y las proteínas que lo contienen

Hemo a	<ul style="list-style-type: none"> • Citocromo c oxidasa
Hemo b	<ul style="list-style-type: none"> • Catalasa • Citocromos tipo b • Globinas • Peroxidasas
Hemo c	<ul style="list-style-type: none"> • Citocromos tipo c • Hidroxilamino reductasa
Hemo d	<ul style="list-style-type: none"> • Catalasas • Citocromos tipo d
Hemo d1	<ul style="list-style-type: none"> • Citocromo cd1 nitrito reductasa
Hemo o	<ul style="list-style-type: none"> • Citocromo o oxidasa
Hemo P460	<ul style="list-style-type: none"> • Hidroxilamina oxido reductasa
Sirohemo	<ul style="list-style-type: none"> • Enzimas con sirohemo Fe4S4

Estado de coordinación del átomo de hierro

Dependiendo de las características de la interacción entre el o los ligantes con el hierro, este átomo puede verse desplazado en mayor o menor medida del plano que conforman los átomos de nitrógeno de los pirroles, es decir, presenta una geometría distinta cuando se encuentra pentacoordinado y en alto espin que cuando se encuentra tetra, penta o hexa coordinado pero en bajo espin. Esta geometría depende en gran medida de si el ligando es débil o fuerte. (Fig 4). De la misma manera, la presencia y naturaleza del quinto y sexto ligando del hierro resultan factores cruciales que determinan la reactividad de cualquier hemoproteína (Chapman, et al., 1997).



Figura 4 Distintas geometrías del compuesto de coordinación del hierro dependiendo del tipo de ligando.

En el mismo sentido, existen evidencias de que la identidad del ligando unido al hierro en un estado de coordinación puede cambiar si se varía por ejemplo el pH (Ferrer, et al., 1993), cambiando así el estado de coordinación del hierro. Por esta razón, se ha propuesto que el control de este factor es fundamental en el mecanismo de las hemoproteínas, por lo que existen una gran cantidad de trabajos al respecto. (Kassner, 1972 ; Churg, et al., 1986 ; Schejter, et al., 1996 ; Gunner, et al., 1997 ; Mauk and Moore, 1997)

Función y grupo prostético

Las hemoproteínas en general pueden llevar a cabo una enorme variedad de funciones, esto en gran medida debido a la extraordinaria versatilidad que le confiere la interacción de su grupo prostético con los aminoácidos de la proteína (Chapman, et al., 1997). Esta versatilidad está determinada principalmente, por tres distintos factores que influyen en el potencial de óxido reducción del hemo (Mus-Veteau, et al., 1992).

En primer lugar, los grupos que se encuentran ocupando las posiciones libres en los pirroles tienen un efecto sobre dicho potencial. El segundo factor es la identidad de los ligantes que interaccionan con el átomo de hierro una vez que el grupo hemo se encuentran dentro de la proteína. Usualmente, los aminoácidos que llevan a cabo esta interacción son metionina, cisteína, histidina, y en ocasiones tirosina. Todos estos aminoácidos poseen como característica común una cadena lateral de carácter electrodonador. El tercer factor determinante, es el ambiente que rodea al grupo hemo, ya que en última instancia, esta es la única diferencia entre hemoproteínas que poseen una misma clase de hemo, en donde el primer factor es el mismo y generalmente, aunque no siempre, el segundo también es igual.

Gracias a estos factores principales, dentro de esta familia de proteínas, existe un rango de potencial redox desde -0.2 hasta +0.5 volts (Kendrick, 1992).

Quizá la clasificación mas utilizada para las hemoproteínas esta dada por la función bioquímica que desempeñan, la cual de manera general se puede dividir en tres grupos principales:

Tabla II Clasificación de hemoproteínas de acuerdo a su función.

Función	Algunos ejemplos
Almacenamiento y transporte de oxígeno	<ul style="list-style-type: none"> • Mioglobina • Hemoglobina
Transferencia de electrones	<ul style="list-style-type: none"> • Citocromo c • Citocromo b • Citocromo b559
Catálisis enzimática	<ul style="list-style-type: none"> • Ligninperoxidasa • Catalasa • Cloroperoxidasa • Citocromo P450 • Manganesoperoxidasa • Lactoperoxidasa

Hemoproteínas como biocatalizadores

Las hemoproteínas que de manera natural llevan a cabo la catálisis de reacciones, generalmente oxidativas, son principalmente las peroxidadas y los citocromos P450. A continuación se describirán algunos de los ejemplos más representativos de este tipo de enzimas.

Peroxidasas

Las peroxidadas son enzimas cuya importancia es evidente debido a su amplia distribución en la naturaleza, tanto en el reino vegetal como en el animal, por lo que se encuentran entre las proteínas que se han estudiado más exhaustivamente. Poseen la capacidad de utilizar un hidroperóxido, de manera más común al peróxido de hidrógeno (aunque también pueden usar ciertos alquilhidroperóxidos) como aceptor de electrones para catalizar reacciones de oxidación de una amplia gama de compuestos donadores de electrones, como fenoles, aminas, hidroquinonas, etc. Estos sustratos pueden ser tanto de carácter orgánico como inorgánico (Everse and Everse, 1991).

El rango de peso molecular que se ha encontrado entre las peroxidadas fluctúa desde 35 kD hasta 100 kD, con una longitud de 251 hasta 726 residuos respectivamente. Su estructura general consta de 10-11 α -hélices unidas por giros y vueltas, mientras que las estructuras tipo β son un componente minoritario. La estructura en su conjunto se encuentra posicionada de manera correcta por la presencia de un puente salino entre una asparagina y una arginina y por varias glicinas y prolinas muy conservadas (Banci, 1997).

Prácticamente todas las peroxididasas poseen un grupo hemo tipo B. Dentro de este grupo, el hierro coordinado con los cuatro átomos de nitrógeno de los heterociclos se coordina con una histidina altamente conservada (una excepción es la cloroperoxidasa cuyo quinto ligando está dado por un grupo tiolato), mientras que la sexta posición está libre, obteniéndose un hierro pentacoordinado en estado de alto espín (Fig. 4). Estas enzimas se pueden dividir en dos grandes grupos o superfamilias, dependiendo del tipo de organismo del cual provengan:

Tabla III. Clasificación de las peroxididasas dependiendo de su origen

Peroxidasas de origen animal	<ul style="list-style-type: none"> • Lactoperoxidasa • Mieloperoxidasa • Peroxidasa de tiroides
Peroxidasas provenientes de hongos, bacterias y plantas	<ul style="list-style-type: none"> • Ligninoperoxidasa • Manganesoperoxidasa • Peroxidasa de rábano blanco • Citocromo c peroxidasa

La comparación de estructuras de enzimas pertenecientes al segundo grupo de peroxididasas, como es el caso de la ligninoperoxidasa, de la manganesoperoxidasa y de la citocromo c peroxidasa ha permitido establecer que presentan un plegamiento muy similar (Banci, 1997). Asimismo, la comparación extensiva entre las secuencias de aminoácidos de peroxididasas provenientes de hongos, bacterias y plantas sugiere que estas enzimas se encuentran relacionadas evolutivamente (Welinder, 1992). Esta comparación conjuntamente con el análisis de las estructuras cristalográficas disponibles a la fecha, han permitido dividir a esta superfamilia en tres grupos distintos (Smith and Veitch, 1998):

Tabla IV. Clasificación de una de las superfamilias de las peroxididasas.

	Procariotas intracelulares (clase I)	Fúngicas extracelulares (clase II)	Secretadas por plantas (clase III)
Ejemplos	<ul style="list-style-type: none"> • Citocromo c peroxidasa • Ascorbato-peroxidasa de citosol 	<ul style="list-style-type: none"> • Lignino-peroxidasa • Manganeso-peroxidasa 	<ul style="list-style-type: none"> • Peroxidasa de rábano blanco • Peroxidasa de cacahuete
Puentes disulfuro	Ausentes	8-10	8-10
Glicosilación	Ausentes	Alto porcentaje	Alto porcentaje
Iones calcio	Ausentes	2	2
Tirosinas	Presentes	Ausentes	Presentes
Sitio proximal	Triptófano	Fenilalanina	Fenilalanina

El mecanismo general que se ha propuesto para su función se encuentra esquematizado en la figura 5. Dicho mecanismo implica una serie de pasos que involucran la transferencia de electrones intermolecularmente y se inicia con el átomo de hierro en estado oxidado (Fe^{+3}). Este reacciona con una molécula de peróxido de hidrógeno para formar un radical catiónico de porfirina que contiene al hierro en estado de oxidación +4 (especie oxiferil), el cual se conoce como Compuesto I de las peroxidasa. Esta es una reacción que involucra a 2 electrones, en la cual la proteína es oxidada y el peróxido es reducido hasta agua. Este radical, en presencia de una molécula donadora de electrones, produce un radical libre de dicha molécula al recuperar un electrón, formando el Compuesto II. Este compuesto a su vez, puede oxidar otra molécula de sustrato reductor, para regresar al estado inicial de la enzima.

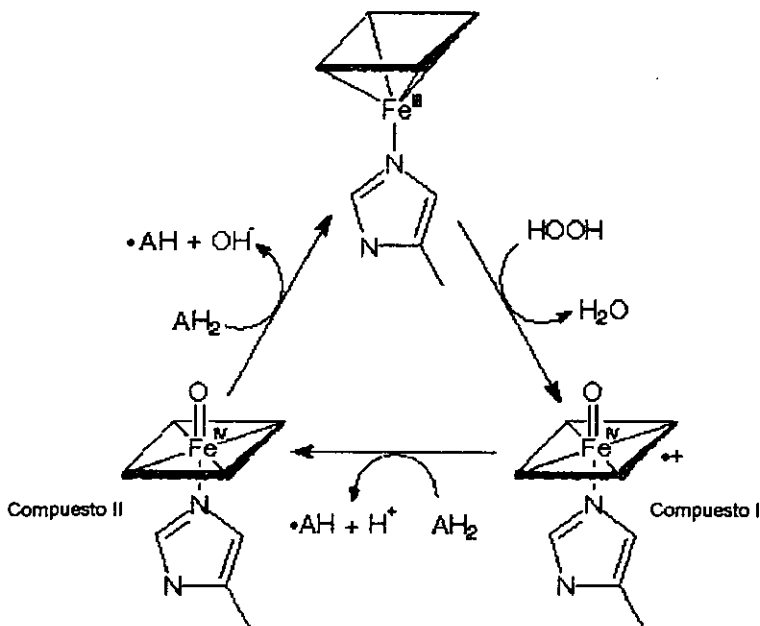


Figura 5 Ciclo normal de las peroxidasa.

Las peroxidasa en general poseen una gran ventaja con respecto a otras enzimas en el sentido de que usualmente no es necesario que el sustrato se una en una cavidad particular de la proteína, sino que más bien la reacción que catalizan involucra una transferencia de electrones a larga distancia, desde el sustrato a través de la proteína hasta su grupo hemo. De esta manera, las peroxidasa no necesitan de mayores cambios estructurales para adaptarse a un amplio espectro de sustratos (Banci, 1997), por lo que no solamente están involucradas en infinidad de procesos naturales, sino que también poseen un enorme potencial de aplicación en otros procesos.

Entre las peroxididasas que mayor interés han propiciado debido al amplio espectro de reacciones que catalizan y a su elevado potencial redox, se encuentran la lignino peroxidada, y la manganeso peroxidada.

Ligninoperoxidasa

Esta enzima es uno de las principales constituyentes del sistema degradativo de una clase de hongos denominados ligninolíticos. Estos microorganismos catalizan la degradación de la lignina, un polímero natural y aromático el cual es el más abundante del planeta después de la celulosa. Así, este sistema ligninolítico, incluida la ligninoperoxidasa, juegan un papel fundamental en el ciclo del carbono sobre la tierra.

La ligninoperoxidasa es una enzima extracelular secretada al medio por el hongo cuando éste se encuentra en condiciones limitantes de nitrógeno. Presenta un peso molecular aparente de 42 kDa, sin embargo, al estar altamente glicosilada, (aproximadamente un 15% en peso de carbohidratos) posee un peso molecular real de alrededor de 36 kDa (Gold and Alic, 1993) que corresponde con una proteína de 345 aminoácidos.

La ligninoperoxidasa sigue el mismo mecanismo descrito en la figura 5, el cual es común con el resto de las peroxididasas a excepción de la manganeso peroxidada. Una característica que la distingue de las otras peroxididasas del sistema ligninolítico, es que cataliza la oxidación de sustratos aromáticos no fenólicos (Hammel, 1985). Esta enzima es capaz de catalizar la oxidación de sustratos poco comunes para las peroxididasas en general, debido a que posee un potencial de reducción bastante alto de alrededor de -130 mV (Cai and Tien, 1993).

La regulación de la expresión de la ligninoperoxidasa de *Phanerochaete chrysosporium*, el hongo ligninolítico más estudiado hasta la fecha, es extremadamente compleja, ya que existen 10 genes agrupados que codifican para diferentes isoformas. Estos genes se expresan diferencialmente dependiendo de las condiciones presentes en el medio de cultivo, ya sea de carbono o nitrógeno (Gold and Alic, 1993), o inclusive en presencia de compuestos como antraceno en el suelo (Janse, et al., 1998).

Diversos estudios han establecido la capacidad de la ligninoperoxidasa de catalizar la modificación de distintos compuestos contaminantes. Este tipo de reacciones no solamente incluye la oxidación de compuestos aromáticos como el 1,2,4,5 tetrametoxi benceno (Koduri, et al., 1996), y de compuestos polinucleoaromáticos como el benzo(a)pireno (Sanglar et al., 1986), el antraceno, el metil antraceno y el pireno (Vazquez-Duhalt et al., 1994), si no que también es capaz de eliminar el cloro de los di y tricloro fenoles, los cuales tienen una amplia utilización como conservadores de la madera y en insecticidas (Joshi, et al., 1993; Reddy, et al., 1998).

Manganesoperoxidasa

Esta enzima extracelular es también un componente fundamental del sistema ligninolítico de esta clase de hongos. La proteína madura posee una longitud de 357 aminoácidos, esta altamente glicosilada y presenta un peso molecular de 46 kDa. La estructura general de la proteína es similar a la de otras peroxididasas, presentando una serie de residuos y α -hélices altamente conservados, aunque posee un puente disulfuro extra comparada con la ligninoperoxidasa (Reddy, 1995).

Hasta la fecha se conocen tres genes que codifican para esta enzima en el genoma de *Phanerochaete chrysosporium*, pero a diferencia de los de la lignina peroxidasa, estos no se encuentran agrupados (Orth, et al., 1994). La regulación de estos genes es también muy compleja, ya que su expresión responde a diferentes clases de estímulos como la limitación de nutrientes, la concentración de peróxido de hidrógeno, la de manganeso, y a la velocidad de agitación en cultivo (Janse, et al., 1998).

Una característica que distingue a la manganeso peroxidasa del resto de las peroxidases es su necesidad de manganeso para llevar a cabo su función catalítica. Se sabe que la enzima solo está presente cuando existen condiciones de limitación de nitrógeno y presencia de manganeso, por lo que este ion debe ser necesario para su síntesis así como para su activación (Brown, et al., 1990).

Gracias a la estructura cristalográfica de la manganesoperoxidasa, se ha podido identificar el sitio al que se une el átomo de manganeso, el cual es altamente específico, ya que se ha demostrado que el calcio no compite por este lugar. (Banci, 1997). Se ha establecido que se encuentra muy cercano al grupo hemo de la enzima (Smith and Veitch, 1998).

El mecanismo catalítico de la manganeso peroxidasa es distinto al planteado anteriormente, sin embargo, comienza de manera similar, con la formación del Compuesto I por la reacción entre el peróxido de hidrógeno y el grupo hemo. Este compuesto no solamente tiene la capacidad de oxidar compuestos fenólicos, sino que normalmente oxida una molécula de Mn^{+2} , para formar Mn^{+3} y el Compuesto II de las peroxidases. Como siguiente paso, el Compuesto II oxida primordialmente Mn^{+2} , para formar Mn^{+3} . El ion Mn^{+3} que se forma en las dos reacciones anteriores, tiene también la capacidad de oxidar otros compuestos orgánicos (Cai and Tien, 1993). La manganesoperoxidasa posee el potencial de reducción más elevado entre todas las peroxidases caracterizadas hasta la fecha (Banci, 1997), esto le permite catalizar la oxidación de algunos compuestos que por su potencial redox otras peroxidases son incapaces de llevar a cabo. De esta manera se ha encontrado que esta enzima esta involucrada en la degradación de varios clorofenoles (Joshi and Gold, 1993; Reddy et al., 1998) y en la degradación de hidrocarburos polinucleoaromáticos presentes en la creosota (Bogan and Lamar, 1995). También se ha identificado como una de las enzimas involucradas en la decoloración de productos residuales del blanqueo del papel (Michel, et al., 1991), y de la denitrificación de intermediarios en la ruta de mineralización del 2,4-dinitrotolueno (Valli, et al., 1991). Se ha establecido que esta enzima es capaz de oxidar fenantreno durante la peroxidación de lípidos (Moen and Hammel, 1994). Recientemente, se obtuvo la mineralización de diversos compuestos aromáticos y alifáticos, como el pentaclorofenol, el catecol, la tirosina, el triptófano, el pireno y el 2-amino-4,6-dinitrotolueno utilizando una manganeso peroxidasa del hongo *Nematoloma frowardii* (Hofrichter, et al. 1998).

Citocromo P450

Otra de las denominadas superfamilias de hemoproteínas está constituida por una serie de enzimas nombradas en su conjunto como citocromos P450. Originalmente se llamaron así debido a que se identificaron como pigmentos provenientes del hígado de mamíferos, los cuales al ser reducidos presentaban un máximo de absorción a 450 nm.

Posteriormente se demostró que dicho pigmento era en realidad una hemoproteína con un hemo tipo b, por lo que se adoptó la denominación de citocromos P450 para todas las enzimas relacionadas.

Como ya se mencionó, estas proteínas contienen un hemo tipo b el cual se haya anclado en el sitio activo por un residuo de cisteína absolutamente conservado (Munro and Lindsay, 1996). La presencia de este ligando las distingue de enzimas como las peroxidasas, las cuales de manera general poseen una histidina.

Los citocromos P450 se encuentran distribuidos prácticamente en todos los seres vivos y se ha establecido una clasificación en base a su similitud en secuencia proteica en dos grandes grupos. El primero de ellos, denominado clase B, agrupa a las proteínas de sistemas de tres componentes procarióticos, generalmente de bacterias y mitocondrias y a un citocromo P450 aislado del hongo *Fusarium oxysporum*. Estas proteínas normalmente son solubles y aceptan electrones a partir del NADPH mediante la ayuda de una reductasa que contiene FAD y de una proteína hierro-azufre, la cual transfiere los electrones de la reductasa hacia el citocromo unido al sustrato. El segundo grupo o clase E, reúne al resto de los citocromos, incluyendo al citocromo bacteriano P450_{cam}. Estos generalmente se encuentran unidos a membrana y utilizan un aparato distinto para transferir electrones, el cual parte también del NADPH, pero involucra a una citocromo P450 reductasa que contiene grupos FAD y FMN (Munro and Lindsay, 1996).

De esta forma los citocromos P450 usualmente actúan como oxidasas terminales. La reacción más común que catalizan es la monooxigenación de un sustrato, es decir, la inserción de un átomo de oxígeno a partir de oxígeno molecular, con la consecuente reducción del otro átomo de oxígeno para obtener agua. El ciclo catalítico propuesto para esta clase de catalizadores (figura 6), se encuentra en discusión ya que aún quedan intermediarios importantes por caracterizar (Wong, 1998).

Este ciclo catalítico inicia con la unión del sustrato a la forma basal de la enzima (I). Después de lo cual se convierte en una forma en la que el hierro se encuentra pentacoordinado y en alto espín (II). La reducción por un electrón produce un complejo con el hierro en estado de oxidación +2 (III). Este intermediario es el que se une con el oxígeno molecular para formar un aducto semiestable (IV). Este mismo compuesto puede unirse al monóxido de carbono formando un aducto alternativo (V). En todos los pasos anteriores se han aislado y caracterizado los intermediarios, sin embargo, a partir de este punto, los pasos subsiguientes son hipotéticos. Se propone que se forma un radical peroxilo férrico (VI), el cual promueve un rompimiento heterolítico del enlace O-O para formar (VII). Finalmente, este intermediario con es el responsable de la oxidación del enlace C-H, formando el compuesto ROH y la enzima nativa.

A pesar de la gran cantidad de secuencias de citocromos P450 que se conocen hasta la fecha, únicamente se cuenta con 4 estructuras cristalográficas de estas proteínas (Kellner, et al., 1998). Dos de estas estructuras provienen de *Pseudomonas* (P450_{cam} y P450_{terp}), una de ellas de un actinomiceto (P450_{cyt}) y una más de un bacilo (P450_{BM-3}). Su análisis ha permitido establecer que su estructura terciaria es bastante similar, sin embargo, se observan diferencias importantes en el arreglo de las hélices, especialmente en la zona en la que se une el sustrato. Esto es de esperarse, ya que los sustratos que utilizan cada una de estas enzimas es totalmente distinto. El sustrato para el citocromo P450_{cam} es el canfor, el

citocromo P450_{1A2} utiliza terpineol, el P450_{2C9} 6-deoxieritronolido, mientras que el citocromo P450_{BM-3} actúa sobre un ácido graso (Poulos, 1995).

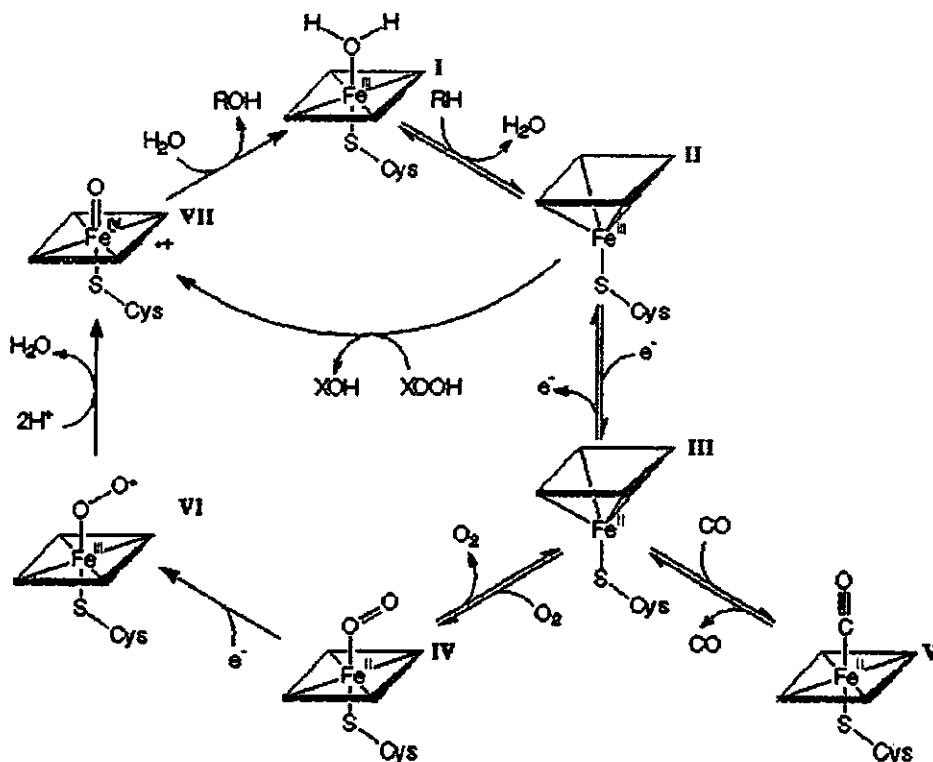


Figura 6. Mecanismo catalítico propuesto para los citocromos P450.

La manera en que los citocromos P450 llevan a cabo su unión al sustrato las distingue de las peroxidasas, ya que los primeros, deben proporcionar una ruta de acceso hacia la cavidad del hemo, así como una serie de interacciones adecuadas para que el sustrato interactúe de manera estereoespecífica con el oxígeno unido al hemo (Poulos, 1995).

Las características distintivas de este tipo de enzimas les permiten catalizar diversos tipos de transformaciones químicas como hidroxilaciones alifáticas, epoxidaciones, dealquilaciones y dehalogenaciones (Kellner, et al, 1998). Específicamente, se han utilizado este tipo de enzimas para degradar compuestos tóxicos como la atracina y herbicidas derivados de tiocarbamato (Nagy, et al., 1995). También son capaces de dehalogenar reductivamente metano y etano halogenados (Li and Wackett, 1993), así como catalizar la oxidación de benzo(a)pireno (Jones, et al., 1995), antraceno y alquilantracenos (Anzenbacher et al., 1996) y fenantreno (Rahimtula, et al., 1988).

Mioglobina y globinas

La mioglobina pertenece a una familia de proteínas denominada genéricamente como globinas. La función fundamental de estas consiste en el transporte y/o almacenamiento de oxígeno molecular. Prácticamente todas las proteínas que pertenecen a esta familia, poseen un grupo hemo tipo b y presentan un plegamiento similar característico, constituido por 8 alfa hélices que conforman una cavidad dentro de la cual se une el grupo hemo (Aronson, 1991).

El oxígeno molecular se une reversiblemente con el hemo de la proteína, funcionando como un sexto ligando del átomo de hierro. El quinto ligando dentro de esta estructura generalmente es una histidina proximal altamente conservada. Ahora bien, a pesar de que la función principal del hemo pentacoordinado de la mioglobina consiste en unir oxígeno molecular, se ha demostrado que esta proteína es capaz de llevar a cabo la catálisis de la oxidación, en presencia de peróxido de hidrógeno, de compuestos reductores como el fenol y aminas aromáticas (Stolze and Nohl, 1995) en reacciones similares a las peroxidasas (Everse, et al., 1994 ; Everse, et al., 1998).

Citocromos

Los citocromos fueron aislados por primera vez a partir de tejidos de distintos organismos y al igual que en el caso de la hemoglobina, en un principio se pensó que estos constituían una serie de pigmentos. Posteriormente se estableció que estos compuestos eran realmente varias proteínas que al igual que las globinas, contenían un grupo hemo dentro de su estructura. Así, éstas se pueden definir como un grupo de proteínas que transfieren electrones o protones y contienen dentro de su estructura uno o más grupos hemo. Existen diversas clases de citocromos las cuales se pueden diferenciar entre sí por distintos criterios: su similitud en secuencia proteica, su tipo de grupo hemo o el tipo de ligantes axiales que contienen (Figura 7).

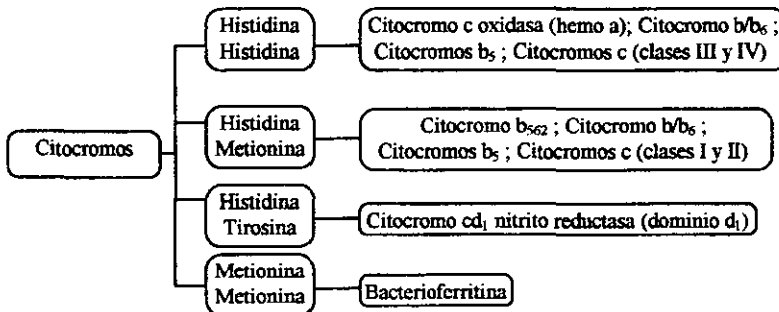


Figura 7. Clasificación de los citocromos de acuerdo a su estado de coordinación y al tipo de ligando.

Entre los citocromos que más se han estudiado debido a su ubicuidad, a la importancia de su función y a su facilidad de purificación, se encuentran los citocromos tipo c. Estas proteínas se encuentran presentes en toda célula que posea un núcleo, desde

levaduras hasta humanos (Dickerson, 1972). Son de forma globular, solubles, relativamente pequeños con un peso molecular de alrededor de 13 kD. Poseen un grupo hemo tipo c dentro de una estructura secundaria en la que predominan alfa hélices (figura 8), por lo que recientemente se le ha propuesto como el ejemplo típico de todo un grupo de dominios de proteínas, denominado clase II (Borman, 1998).

Los citocromos se localizan en el interior de la membrana mitocondrial y su función principal consiste en transportar electrones dentro de la cadena respiratoria desde la citocromo c reductasa hasta la citocromo c oxidasa, ambas unidas a la membrana de la mitocondria. Debido a su amplia distribución en la escala filogenética y a sus características de solubilidad y estabilidad, los citocromos representan un modelo para el estudio del plegamiento de proteínas (Das et al., 1998), de la transferencia de electrones intermolecular (Mauk, 1991 ; Liang et al., 1988 ; Pielak, et al., 1985 ; Davies et al., 1993) y del efecto de diversos factores sobre la estabilidad de la estructura proteica como la temperatura, el pH, y las mutaciones puntuales (Greene. et al., 1993; Caffey and Cusanovich, 1994; Willis et al., 1993).

En el caso de los citocromos tipo c, su grupo hemo se encuentra unido covalentemente a la cadena polipeptídica a través de dos enlaces tioeter, entre dos cisteínas altamente conservadas y dos carbonos de los grupos etilo de la porfirina. El átomo de hierro dentro de esta estructura se encuentra hexacoordinado y de manera general, el quinto y el sexto ligando del hierro son una histidina y una metionina, aunque se ha propuesto que la identidad de estos ligantes puede modificarse con el pH (Ferrer, et al., 1993).

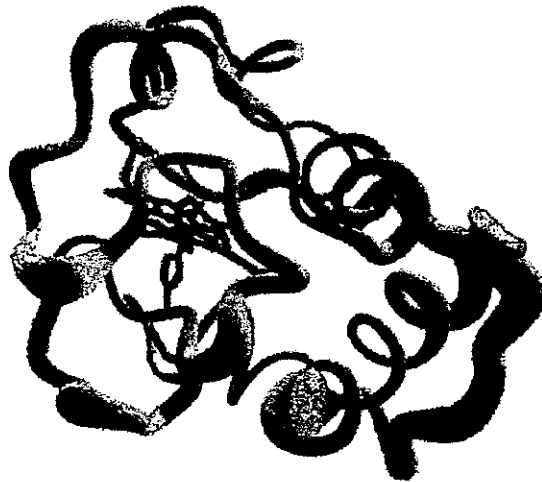


Figura 8. Citocromo c típico en el que se aprecian sus alfa hélices y el grupo hemo con un hierro hexacoordinado.

El citocromo tipo c lleva a cabo su función de transportar electrones mediante el cambio reversible en el estado de oxidación del hierro dentro del grupo hemo, del cual se ha estimado que posee un potencial redox que oscila en un intervalo de 260 a 150 mV, dependiendo del organismo del que provenga (Kendrick, 1992). Se ha postulado que esta proteína interacciona con la citocromo c peroxidasa a través de residuos cargados positivamente, principalmente lisinas, las cuales rodean uno de los bordes del hemo, sin embargo, el análisis del complejo entre estas proteínas indica que la mayoría de las interacciones son hidrofóbicas (Pelletier and Kraut, 1992). Existen un gran número de estudios acerca de los factores que determinan la transferencia de electrones en esta proteína, sin embargo, todavía no se comprenden completamente.

Citocromo c como biocatalizador.

A pesar de que la función principal dentro de la célula del citocromo tipo c es la de transportar electrones se ha reportado que es capaz de catalizar la peroxidación de lípidos *in vivo* (Radi, et al., 1993), lo que sugiere que podría estar involucrado en otros procesos celulares como el estrés oxidativo, promoviendo la oxidación, mediante radicales libres, de biomoléculas en presencia de peróxido de hidrógeno (Deterding, et al., 1998).

Se ha demostrado que el citocromo c es capaz de catalizar, *in vitro*, la oxidación de diversos compuestos donadores de electrones como el ABTS, la 4-amino-antipirina y el luminol de forma análoga a las reacciones catalizadas por las peroxidases (Radi, 1991). También puede reaccionar con 4-nitrofenol para promover su hidroxilación y la oxidación del ácido 2-ceto-4-tiometil butírico (Florence, 1985). Sin embargo, aún no está clara la manera en que el citocromo c lleva a cabo estas oxidaciones, ya que aparentemente el radical que se forma de la reacción entre esta proteína y el hidropéroxido es distinto al que normalmente se encuentra en presencia de una peroxidasa, por lo que el mecanismo podría ser distinto (Barr and Mason, 1995).

El citocromo c no solamente es capaz de catalizar este tipo de oxidaciones, sino que también presenta una serie de características, especialmente de estabilidad, que lo constituyen como una proteína muy singular. En primer lugar, y a diferencia de la mayoría de las hemoproteínas, el grupo hemo del citocromo c está unido covalentemente a la proteína, por lo que es difícil que lo pierda en condiciones en las que otras enzimas generalmente lo hacen, esto le confiere estabilidad en condiciones de cambios de pH bruscos, en presencia de solventes orgánicos, y a altas temperaturas (Vázquez-Duhalt, 1999). De hecho, se ha demostrado que es capaz de conservar actividad en un rango muy amplio de pH, que va desde pH 2 hasta pH 10, además de ser activa en concentraciones de hasta un 90% en solventes miscibles con agua como el tetrahidrofurano (Vázquez-Duhalt et al., 1993). Esta proteína es altamente termoestable, ya que puede catalizar reacciones inclusive a 120 °C, con una actividad máxima a 80 °C (Vázquez-Duhalt, 1999). Otro factor muy importante es que el citocromo de levadura se ha podido expresar en *E. coli*, por lo que resulta mucho más sencillo llevar a cabo reacciones de mutagénesis, y producir proteínas recombinantes en cantidades suficientes para su estudio. (Pollock et al., 1998).

Basándose en estas características, el citocromo c ha sido utilizado como biocatalizador para la oxidación de diferentes moléculas de interés. En especial de compuestos tóxicos, como los hidrocarburos polinucleoaromáticos. Así, es capaz de

hidroxilar al benceno en presencia de un hidroperóxido utilizando como fase un solvente orgánico con un contenido de agua muy bajo (Akasaka et al., 1994). También puede catalizar la oxidación de otros compuestos aromáticos como el antraceno, el pireno y carbazol (Torres et al., 1995) y la obtención de sulfóxidos a partir de sus respectivos compuestos azufrados como el dibenzotiofeno, el tiantreno y el difenil sulfuro (Vazquez-Duhalt, et al., 1993). Se ha demostrado que tanto el citocromo c libre como inmovilizado en polimetil glutamato, puede catalizar reacciones oxidativas como la O-demetilación, la S-oxidación y la epoxidación de olefinas, mediante un mecanismo similar al que utiliza el citocromo P450 (Akasaka et al., 1993).

Gracias a la estabilidad estructural del citocromo c, se han podido llevar a cabo modificaciones químicas del mismo que permiten cambiar tanto su comportamiento catalítico como su estabilidad. La modificación de los grupos amino libres de la proteína permitió aumentar su eficiencia catalítica para la oxidación de compuestos polinucleoaromáticos (Vazquez-Duhalt et al., 1995). De la misma forma, la modificación de los grupos amino y carboxilo con polietilenglicol y metil trimetil silil (TMS), provocaron que fuera capaz de oxidar una serie de 16 compuestos aromáticos, de los cuales solamente 8 fueron oxidados por la proteína sin modificar (Tinoco and Vazquez-Duhalt, 1998).

Estabilidad química de las proteínas.

Uno de las características más relevantes de cualquier enzima o biocatalizador está dada por su estabilidad. El aspecto que mayormente se ha estudiado en este sentido es el de la estabilidad térmica, la cual se relaciona de manera directa con la conformación de la proteína. Sin embargo, un aspecto muy importante esta constituido por la estabilidad de cualquier catalizador o proteína a distintas condiciones químicas, las cuales pueden inclusive cambiar como consecuencia de la acción misma del catalizador. Estas condiciones pueden producir una serie de modificaciones químicas a la proteína de manera que se vea afectada su conformación e inclusive pueden llevarla hasta su inactivación. Existen diversas reacciones que solo se producen cuando se sustrae a la proteína de su ambiente normal (Volkin, et al., 1997), sin embargo, también existen modificaciones que resultan trascendentes *in vivo*. A continuación se darán algunos ejemplos.

Desamidación de asparagina

Una modificación química muy frecuente es la deaminación de residuos de asparagina para obtener ácido aspártico y ácido isoaspártico. Esta puede ocurrir en un rango muy amplio de pH y se ha observado tanto en el aislamiento de proteínas como *in vivo*, proponiéndose en este último caso una relación con la degradación dentro del recambio de proteínas. (Statdman, 1990).

Degradación de puentes disulfuro

Los residuos de cisteína de manera natural en las proteínas, tienden a formar puentes disulfuro ya sea intra o intermoleculares. Se ha propuesto que estas interacciones estabilizan directamente la forma plegada de la proteína y reducen la entropía de conformación del estado no plegado (Kosen, 1992). De aquí se deriva la importancia de la modificación en estos residuos o de los puentes disulfuro en la estabilidad proteica. La degradación de estos puentes se produce por un mecanismo de eliminación tipo β α pH alcalino, dentro del cual, un ión hidroxilo o un grupo tiol, pueden sustraer un protón del carbono α del aminoácido, produciendo intermediarios inestables que pueden dar origen a productos de descomposición (en el caso del grupo tiol) o inclusive el entrecruzamiento poco común entre aminoácidos como lisina y alanina (en el caso del grupo hidroxilo) (Volkin, et al, 1997).

Glicosilación

Algunos aminoácidos, como la lisina, pueden reaccionar con azúcares reductores para formar bases de Schiff, las cuales a través de una serie de rearrreglos llegan hasta compuestos denominados de Amadori, formándose aductos covalentes de la proteína. Se ha demostrado que la glicosilación de algunas enzimas como la ribonucleasa A propicia que ésta forme dímeros y trímeros. (Volkin, 1997).

Oxidación de proteínas.

Uno de las reacciones más estudiadas que provocan una inestabilidad química de las proteínas es su oxidación. Esta ha recibido un gran interés en los últimos años debido a su posible relación con importantes procesos celulares como el recambio de las proteínas, el envejecimiento y estados patológicos como la arterosclerosis y el cáncer (Vilar-Rojas, et al., 1996). La oxidación de proteínas puede afectar distintas regiones de la proteína, ya sea un aminoácido, grupo de aminoácidos o un grupo prostético. Sin embargo, la modificación sobre cualquiera de estas entidades puede producir un cambio en las características de estabilidad. Entre los aminoácidos más susceptibles a la oxidación se encuentran la metionina, el triptófano, y la cisteína (Vogt, 1995).

Uno de los principales mecanismos mediante los cuales las proteínas sufren una oxidación es a través de radicales libres, por lo que existen diversas revisiones al respecto (Vilar-Rojas et al., 1996 ; Volkin, et al., 1997 ; Dean, et al., 1997). La fuente primaria de estos radicales está constituida por pequeñas "fugas" de la cadena de transporte de electrones de radicales libres como el superóxido (O_2^-). Este a su vez, puede producir especies mucho más reactivas como el radical peroxilo (ROO^\cdot), el alcoxilo (RO^\cdot), el hidroxilo (HO^\cdot) (Dean, et al., 1997). Además del oxígeno, una fuente muy importante de radicales libres está dada por los metales de transición, hierro y cobre, los cuales conjuntamente con el oxígeno y el peróxido de hidrógeno producen radicales por una reacción denominada de Fenton.

En el caso especial de las peroxidasas y de proteínas relacionadas, como el citocromo c, el ciclo catalítico que se ha propuesto para ellas implica la activación del grupo prostético por parte del peróxido de hidrógeno. Este mismo compuesto, a su vez, provoca la

inactivación de la proteína. Existen numerosos estudios acerca de la inactivación de enzimas como la ligninoperoxidasa (Wariishi and Gold, 1990 ; Hu, et al., 1993), la peroxidasa de rábano blanco (Arnao et al., 1990), la Lactoperoxidasa (Huwiler et al., 1986), la cloroperoxidasa (Shevelkova, et al., 1996), etc. Sin embargo, debido a la complejidad del mecanismo, aún no está claro ni la identidad ni el mecanismo de inactivación de las peroxidases, lo que limita en gran medida cualquier aplicación ya sea actual o futura de estas enzimas en algún proceso biocatalítico.

Objetivo general

Estudio del mecanismo de inactivación del citocromo c por acción del peróxido de hidrógeno.

Objetivos particulares

Identificación de los productos de reacción entre el citocromo c y el peróxido de hidrógeno.

Análisis y comparación de la estabilidad de distintas variantes de citocromo c de levadura.

Obtención de variantes de esta proteína por mutación sitio específica más estables al peróxido de hidrógeno

Soluciones y Medios de cultivo

Cloruro de calcio 0.1 M
0.55 g de cloruro de calcio
Llevar a 100 ml con agua destilada
Esterilizar por filtración o con vapor.

Buffer de fosfatos pH 6.0 60 mM
1.23 g de H_2PO_4^-
0.25 g de HPO_4^{2-}
Llevar a 200 ml con agua destilada

Annealing buffer 10 X
Tris-HCl pH 7.5 100 mM
 MgCl_2 100 mM
NaCl 500 mM

Synthesis buffer 10X
Tris-HCl pH 7.5 100 mM
DNTPs (dideoxynucleótidos) 5 mM
ATP (dATP) 10 mM
DTT (ditiotreitól) 20 mM

Buffer de PCR 10X
KCl 500 mM
Tris-HCl pH 8.3 100 mM
 MgCl_2 15 mM

Buffer TBE 10X
216 g de Trisma base
18.6 g de EDTA
(etilendiamin tetraacetato
disódico)
110 g de ácido bórico
Ajustar a 2 l con agua destilada.
Checar que el pH sea de 8.3, filtrar.

Medio LB
10 g de triptona
5 g de extracto de levadura
5 g de cloruro de sodio
Ajustar a 1 l con agua.
Esterilizar con vapor

Medio YT
10 g de triptona
75 g de extracto de levadura
37.5 g de NaCl
Llevar a 1 l con agua destilada
Esterilizar con vapor

NaOH/SDS
NaOH 0.2 M
SDS (dodecil sulfato de sodio) 1%

EDTA 0.5 M
17 g de EDTA
Disolver en 50 ml de agua
Esterilizar con vapor

Buffer para lisozima
Glucosa 50 mM
EDTA pH 8.0 25 mM

Lisozima
20 mg de lisozima en 1 ml de
buffer TE

Buffer TE
Tris-HCl pH 8.0 10 mM
EDTA 1 mM

Reactivos y materiales

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico o ultrapuro de la marca Sigma, Baker o Aldrich.

Las enzimas de restricción fueron de la marca Gibco, Biolabs y Organics Research.
Los solventes usados fueron de la marca Baker grado HPLC.

El sistema de expresión del gen del iso-1-citocromo c y las distintas variantes de citocromo c fueron generosamente proporcionadas por el Dr. Grant Mauk y el Dr Federico Rosell (Universidad de la Columbia Británica).

Las cepas de *E coli* que se utilizaron fueron BMH 71-18 y DH5 α para la construcción de mutantes de citocromo c y la cepa JM101 para su producción.

Métodos

Identificación de productos de oxidación

Productos de oxidación del grupo hemo

Para establecer la identidad de los productos de oxidación sobre el grupo hemo se preparó una solución de citocromo c con una absorbancia alrededor de 0.5 a 408 nm. Posteriormente ésta fue oxidada en presencia de peróxido de hidrógeno 1 mM y los productos de oxidación se intentaron aislar e identificar por diversas técnicas, como la cromatografía en capa fina (usando placas de sílica gel y diversas combinaciones de solventes como fase móvil), HPLC (usando tanto una columna polar como una no polar), cromatografía de gases y espectrometría de masas. También se ensayaron distintas modificaciones para aplicar los métodos anteriores.

Análisis de aminoácidos

Para analizar los productos de oxidación de la proteína, se llevó a cabo un análisis de aminoácidos usando una solución de citocromo c de levadura con 8 nanomoles de proteína en 150 μ l de buffer. Esta solución se incubó con 4 micromoles de peróxido durante 10 minutos. Para detener la reacción se agregó un exceso de metabiosulfito de sodio. Se realizó un blanco con la solución de la proteína únicamente y ambas soluciones se ensayaron en un analizador Beckman 6300.

Construcción de mutantes de citocromo c.

Sistema de expresión

El sistema de expresión en *E coli* de citocromo c consiste en un plásmido derivado de pUC 18 que contiene tanto al gen que codifica para el iso-1-citocromo c de levadura (denominado CYC 1), como al gen que codifica a la enzima citocromo c hemoliasa (CYC3). Ambas proteínas son expresadas bajo el control de un promotor *lac* (Pollock, 1998).

El cambio C102T, común a todas las variantes que se utilizaron y produjeron, no afecta ninguna de las características de la proteína, incluida su estabilidad al peróxido de hidrógeno (Torres, et al., 1995), sin embargo evita su dimerización *in vitro*.

El sistema de expresión del gen del iso-1-citocromo c y las distintas variantes de citocromo c fueron generosamente proporcionadas por el Dr. Grant Mauk y el Dr Federico Rosell (Universidad de la Columbia Británica).

Las cepas de *E coli* que se utilizaron fueron BMH 71-18 y DH5 α para la construcción de mutantes de citocromo c y la cepa JM101 para su producción.

Métodos

Identificación de productos de oxidación

Productos de oxidación del grupo hemo

Para establecer la identidad de los productos de oxidación sobre el grupo hemo se preparó una solución de citocromo c con una absorbancia alrededor de 0.5 a 408 nm. Posteriormente ésta fue oxidada en presencia de peróxido de hidrógeno 1 mM y los productos de oxidación se intentaron aislar e identificar por diversas técnicas, como la cromatografía en capa fina (usando placas de sílica gel y diversas combinaciones de solventes como fase móvil), HPLC (usando tanto una columna polar como una no polar), cromatografía de gases y espectrometría de masas. También se ensayaron distintas modificaciones para aplicar los métodos anteriores.

Análisis de aminoácidos

Para analizar los productos de oxidación de la proteína, se llevó a cabo un análisis de aminoácidos usando una solución de citocromo c de levadura con 8 nanomoles de proteína en 150 μ l de buffer. Esta solución se incubó con 4 micromoles de peróxido durante 10 minutos. Para detener la reacción se agregó un exceso de metabisulfito de sodio. Se realizó un blanco con la solución de la proteína únicamente y ambas soluciones se ensayaron en un analizador Beckman 6300.

Construcción de mutantes de citocromo c.

Sistema de expresión

El sistema de expresión en *E coli* de citocromo c consiste en un plásmido derivado de pUC 18 que contiene tanto al gen que codifica para el iso-1-citocromo c de levadura (denominado CYC 1), como al gen que codifica a la enzima citocromo c hemoliasa (CYC3). Ambas proteínas son expresadas bajo el control de un promotor *lac* (Pollock, 1998).

El cambio C102T, común a todas las variantes que se utilizaron y produjeron, no afecta ninguna de las características de la proteína, incluida su estabilidad al peróxido de hidrógeno (Torres, et al., 1995), sin embargo evita su dimerización *in vitro*.

Purificación de DNA de plásmido

Para purificar DNA de plásmido a partir de cepas de *E coli*, se utilizó un método modificado de la lisis alcalina.

Se inoculó un cultivo de 2 ml de medio YT con ampicilina, usando una colonia de la cepa de interés e incubando durante toda la noche a 37 °C.

Se recuperaron 1.5 ml de cultivo en un tubo eppendorf y se centrifugó durante 30 segundos a 15,000 rpm.

Las células se resuspendieron en 100 ul de buffer GET mediante la ayuda de un vortex. Se adicionó 1 ul de RNAasa y se incubó durante 5 minutos en hielo.

Se adicionaron 200 ul de la solución de SDS, se agitó por inversión y se incubó 5 minutos más antes de adicionar 150 ul de solución de acetato de potasio y mezclar por inversión. Se incubó durante 10 minutos en hielo, antes de centrifugar por 10 minutos a máxima velocidad.

Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se adicionó 1 ml de etanol industrial. Se incubó en hielo por 10 minutos y se centrifugó por 20 minutos, removiendo el etanol.

Se resuspendió la pastilla en buffer TE, se adicionaron 100 ul de acetato de amonio 7.5 M y se incubó por 5 minutos en hielo.

Posteriormente, se centrifugó durante 15 minutos, se transfirió el sobrenadante a otro tubo, se adicionaron 450 ul de etanol y se mezcló vigorosamente. Se incubó durante 20 minutos en hielo y después se centrifugó durante 20 minutos a máxima velocidad.

Finalmente, la pastilla de DNA se lavó con etanol al 70% y se secó, para resuspenderla en 30 ul de agua o buffer TE.

Alternativamente a este método, se utilizó un kit de la marca Qiagen, siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Este método se usó especialmente para preparar el DNA necesario para las reacciones de secuencia.

Mutagénesis sitio especifica

Para llevar a cabo la mutagénesis se siguió el esquema general planteado en la figura 9a. A continuación de detallan cada uno de los distintos pasos.

Fosforilación de oligo mutagénico

Se utilizaron 50 picomoles de oligo en 5 ul. A este se le añadieron 1 ul de buffer 10X de kinasa. 1 ul de rATP 10 mM; 25 unidades de T4 polinucleótido kinasa y se llevó a un volumen 10 ul. Se incubó a 37 °C durante 10 minutos. Posteriormente se inactivó la enzima a 65 °C 10 minutos y se utilizaron 120 ng de DNA para la reacción de mutagénesis.

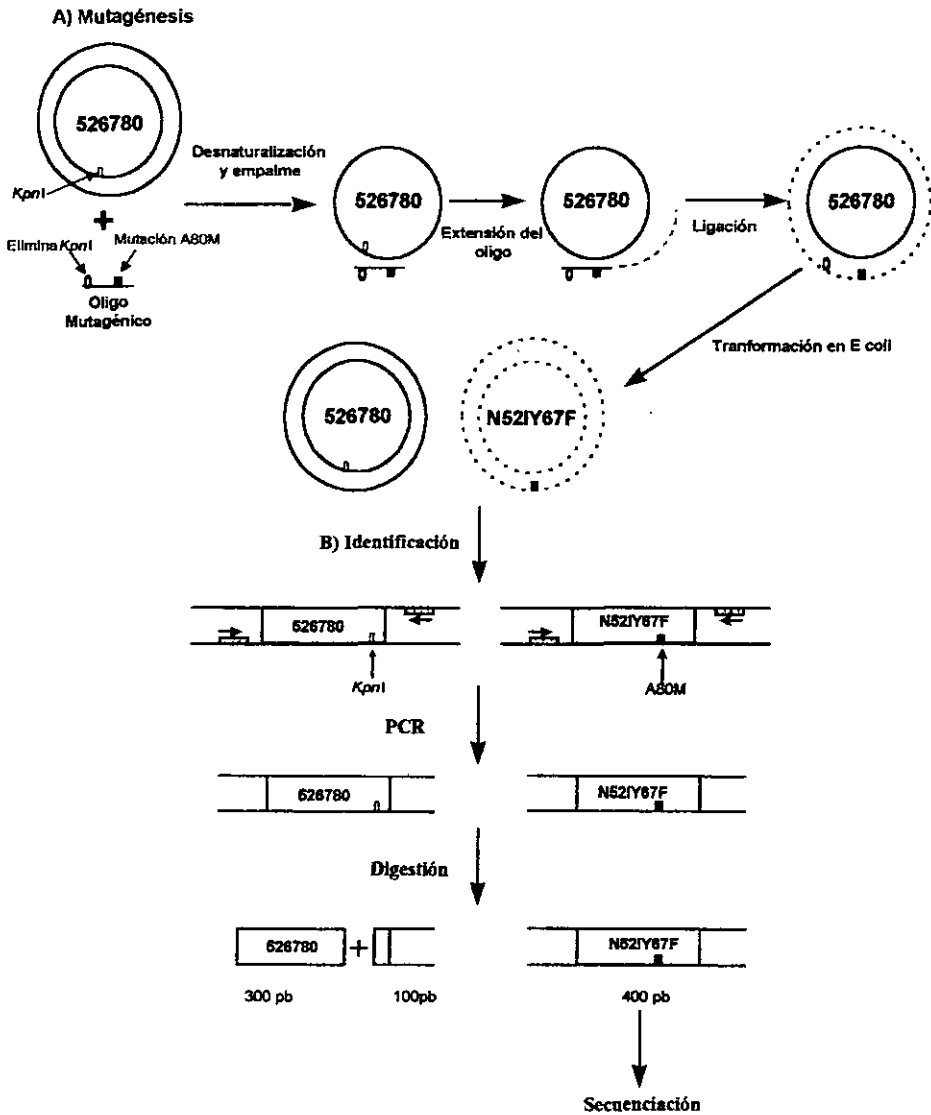


Figura 9. Estrategia seguida para la obtención de mutante N52I/Y67F, a partir de variante N52I/Y67F/M80A (526780), así como su identificación.

Reacción de “annealing”

Para esta reacción se utilizaron 120 ng de DNA de plásmido (purificado por el método descrito anteriormente) en un volumen de 10 ul de agua destilada. A esta solución se agregaron 2 ul de buffer de “annealing” 10X, y 15 pmoles (alrededor de 2 ul) de oligo mutagénico. Se completó el volumen a 20 ul con agua y se calentó a 100 °C por 3 minutos, para después dejar enfriar lentamente hasta temperatura ambiente. Una vez frío, se dejó en hielo durante 5 minutos.

Reacción de síntesis

A la solución anterior se le añadieron 3 ul de buffer de síntesis ; de 2 a 4 unidades de T4 DNA ligasa y de 4 a 6 unidades de T4 DNA polimerasa. Se completó el volumen a 30 ul con agua y se incubó a 37 °C por 90-120 minutos.

Una vez transcurrida la incubación, se precipitó el DNA con 0.5 volúmenes de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol al 95%. Se centrifugó por 30 minutos a temperatura ambiente y se secó a 37 °C.

Después de secar, se resuspendió nuevamente en 17 ul de agua, se adicionaron 2 ul de buffer 4 y 6 unidades de enzima *DpnI*. Se incubó a 37 °C durante 3 horas.

Se precipitó una vez mas con etanol y acetato de amonio. Se centrifugó y secó para resuspender en un volumen final de 10 ul. De esta solución se utilizaron 5 ul para transformar células competentes de *E coli* de la cepa BMH 71-18.

Preparación de células competentes

Se inoculó un tubo conteniendo 2 ml de medio YT y ampicilina, con *E coli* cepa JM101, DH5a ó BMH 71-18, y fue crecido durante toda la noche a 37 °C.

Se transfirió el cultivo anterior a 100 ml de medio YT y se creció durante 3-4 horas, o hasta una densidad óptica de entre 0.4 y 0.7 a 550 nm.

Se centrifugó a 5000 rpm. durante 10 minutos y se resuspendió el paquete de células en 3 ml de cloruro de calcio 0.1 M. Se dejó incubando durante 30 minutos y después se centrifugó de nuevo, bajo las mismas condiciones.

Las células se resuspendieron en 1 ml de una solución de cloruro de calcio con glicerol al 20% y se dejaron incubando en hielo durante 3-5 horas.

Finalmente, esta solución se dividió en alícuotas de 100 ul y se congelaron en nitrógeno líquido para almacenarse a -20 °C, o se dejaron en hielo para ser transformadas.

Transformación de células competentes

Se descongelaron las alícuotas de células competentes en hielo y se añadió el DNA para transformarlas. Se dejó incubando durante 30 minutos.

A estas células, se les aplicó un choque térmico incubando 90 segundos a 42 °C y 5 minutos en hielo. Posteriormente, a esta solución se le agregaron 100 ul de medio LB estéril y se crecieron durante 45 minutos a 37 °C.

Finalmente se sembraron 100 ul de células transformadas en una caja de medio YT con ampicilina, mediante la ayuda de un asa de vidrio.

Identificación de colonias recombinantes

Para identificar los plásmidos con mutación se utilizó una reacción de PCR usando dos oligonucleótidos que amplifican la región completa que contiene al gen del citocromo c (figura 9b).

Las condiciones para esta reacción fueron las siguientes:

5 minutos iniciales de desnaturalización a 94 °C. Después se utilizaron 40 ciclos con un paso de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, una etapa de unión al oligo de 30 segundos a 50°C y una de extensión a 72°C por 25 segundos. Finalmente se usó una paso adicional de extensión de 10 minutos a 72°C. Se utilizó un termociclador Hybaid Enm-E.

De esta amplificación se tomó una alícuota para digerirla exhaustivamente (4-6 horas) con la enzima de restricción Kpn I. Finalmente, esta digestión se corrió en un gel de agarosa al 2% para establecer si el fragmento amplificado se digería en 2 fragmentos, se 300 y 100 pares. La ausencia de este sitio implicaba la presencia de la mutación deseada, ya que dentro del oligonucleótido mutagénico, se eliminó el sitio Kpn I.

La presencia de la mutación se confirmó mediante la secuencia de DNA.

Construcción de mutante Y-

Esta mutante, la cual debía de carecer de tirosinas, fue construida de acuerdo a una estrategia de PCR propuesta por Villarreal and Regalado (1997), en donde se diseñaron 8 oligos en total, cuya secuencia es la siguiente :

Pf1 : 5' CGGTACCCGGGATCCATAACTAAC 3'

Pf2 : 5' GGAGATATATCCATGACTGAATTCAAGGCC 3'

Pf3 : 5' CAAGCTGAAGGGTTTTTCGTTACAGATGCC 3'

Pf4 : 5' ACTAACCCAAAGAAATTTATTCTGTTAC 3'

Pr1 : 5' GGCCTTGAATTCACCTCATGGATATATCTCCTTC 3'

Pr2 : 5' GGCATCGAACGAAAACCTTCAGCTTGACC 3'

Pr3 : 5' GGTACCAGGAATAAATTTCTTTGGGTTAGTCAAGAACTC 3'

Pr4 : 5' AAAAAGCTAGCCTGTTTACTCAGTGGCTTTTTTCAAGAA 3'

Se realizaron mezclas de reacción para PCR utilizando las combinaciones Pf1/Pr1, Pf2/Pr2, Pf3/Pr3 y Pf4/Pr4, cada una por separado (figura 10), bajo las condiciones siguientes :

50 ng de DNA de plásmido pBRTI

500 ng de cada oligonucleótido

200 µM de dNTPs en un volumen final de 50 µl.

Para la reacción de amplificación, se usaron 30 ciclos con 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C.

Posteriormente se tomó una alícuota de cada reacción y se mezcló en una sola, usando las mismas condiciones anteriores, utilizando como oligos Pf1 y Pr4.

Esta reacción se corrió en un gel de agarosa al 2% y se identificó la banda entre 400 y 450 pares de bases, que contenía al gen del citocromo con las mutaciones deseadas. Dicho fragmento se purificó del gel, y se ligó con el vector pBTRI digerido previamente con las enzimas *NheI* y *BamHI*.

Finalmente, la identidad de las mutaciones se confirmó por secuenciación.

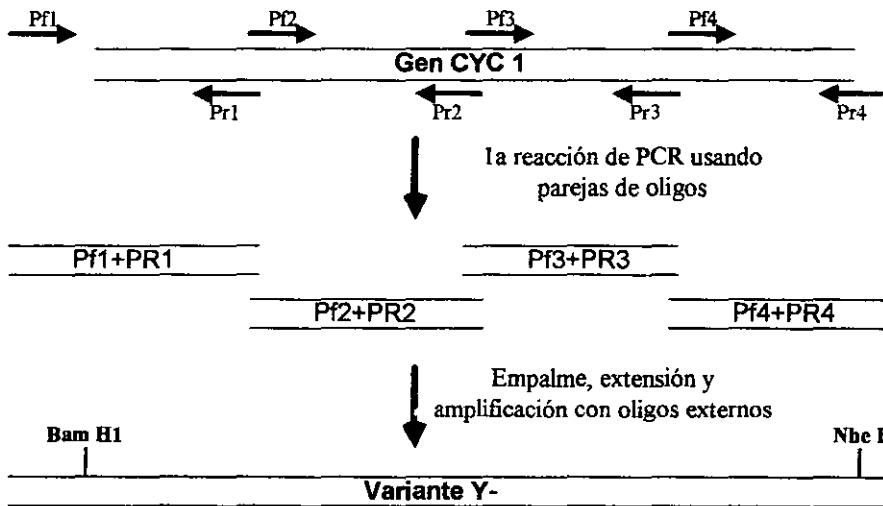


Figura 10. Esquema de la estrategia seguida para la construcción de la variante Y.

Producción y Purificación de proteína mutante

Se inoculó 1 ml de medio YT con ampicilina y se incubó durante toda la noche a 37 °C.

Se inocularon 100 ml del mismo medio con 1 ml del cultivo anterior en un matraz de 1 l.

Este cultivo se utilizó para inocular una jarra de 10 l, la cual se incubó durante 36 horas a 37 °C.

Las células se recuperaron mediante una centrifuga stepless y la masa de células se transfirió a una botella para centrifuga de 500 ml. Se realizaron 3 lavados con buffer 460 mM de fosfato de sodio pH 7.2 y se resuspendieron las células en 40 ml del mismo buffer.

Se adicionaron 25 mg de PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro) en 1 ml de etanol; 10 mg de DNAsa; 2 mg de RNAsa; 200 mg de lizosima y 1 ml de una solución de cloruro de magnesio 2M.

Esta mezcla se incubó durante 2 horas en hielo, se congeló en nitrógeno líquido y se descongeló lentamente a 4 °C durante la noche.

Este proceso se repitió una vez más y después se centrifugó durante 30 minutos a 8000 rpm para recuperar el sobrenadante, que debe mantenerse en hielo. Se lavó dos veces la pasta celular con buffer de fosfatos 460 mM pH 7.2, se centrifugó nuevamente y se juntaron los sobrenadantes.

Se llevó a cabo un paso de precipitación con sulfato de amonio al 30%, agitando la mezcla durante dos horas en hielo. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó a 8000

rpm por 30 minutos, se recuperó el sobrenadante y se dializó durante toda la noche en un recipiente con 30 litros de agua destilada y 100 ml de buffer de fosfatos 46 mM pH 7.2.

Después de la diálisis, se concentró esta solución un aparato de filtración Amicon y se cargó en una columna de sephadex G-25 para remover las sales remanentes.

Se concentró nuevamente hasta un volumen de alrededor de 3 ml, se lavó con varios volúmenes de buffer de fosfatos 20 mM, pH 6.0, hasta intercambiar completamente el buffer y se inyectó en un Sistema de HPLC Perkin Elmer Serie 200, equipado con un cartucho Econo Pack CM de Bio Rad, el cual es una intercambiador catiónico débil. Se usó un gradiente lineal de 25 minutos, desde buffer de fosfatos 20 mM pH 6.0 hasta buffer 20 mM + 0.5 M de cloruro de sodio.

De este gradiente se recuperó un pico con un tiempo de retención de 19.5 min, el cual presentaba un color rojo característico del citocromo c.

Finalmente, se estableció la identidad de la proteína mediante el espectro de absorbancia.

Caracterización de la proteína mutante

Estabilidad al peróxido de hidrógeno de variantes

Se utilizó una solución de citocromo, ya sea nativo o de distintas variantes, en buffer de fosfatos pH 6 previamente atemperado.

Para establecer el 100% de actividad inicial, se mezclaron en una celda, la proteína a ensayar, 25 ul de una solución de cloruro de pinacianol de 20 mg por ml (preparado en acetonitrilo al 15%), 75 ul de acetonitrilo y el volumen restante para 1 ml con buffer de fosfatos pH 6.2. La reacción se inició con 5 ul de solución 0.2 M de peróxido de hidrógeno (1 mM final) y se midió inmediatamente el cambio de absorbancia con respecto al tiempo a 603 nm, en un espectrofotómetro Beckman Serie DU 50. Para medir la inactivación a distintos tiempos, se mezclaron primero el buffer, el acetonitrilo, la proteína y el peróxido, y una vez transcurrido el tiempo necesario, se agregó el cloruro de pinacianol para medir en el espectrofotómetro el cambio de absorbancia en función del tiempo.

Variación de la absorbancia en presencia de peróxido de hidrógeno

Para establecer el cambio de la absorbancia en la región Soret del citocromo al incubarlo con peróxido de hidrógeno, se preparó una solución de 1 ml de citocromo, ya sea nativo o de las distintas variantes, con una absorbancia de alrededor de 0.1 a 408 nm.

A esta solución se le añadió peróxido de hidrógeno a una concentración final de 1 mM, y se midió la absorbancia de esta solución desde 350 hasta 700 nm cada 2 minutos, durante 22 minutos.

Determinación del contenido de hierro de la proteína oxidada

Con el fin de establecer si el grupo hemo de la proteína liberaba su átomo de hierro después de la oxidación, se determinó el contenido de hierro de una solución oxidada después de precipitar las proteínas con ácido tricloroacético. De esta forma, se prepararon 4 ml de una solución de citocromo c con un contenido de 0.66 ug por ml en agua grado HPLC. Se añadió una solución de peróxido concentrada hasta una concentración final de 1 mM y se incubó durante 10 minutos. Se detuvo la reacción con un exceso de metabisulfito sodio y después se agregó ácido tricloroacético hasta una concentración del 20 % para precipitar la proteína. Se centrifugó a 9000 rpm. por 30 minutos y se recuperaron 4 ml para medir el contenido de hierro por absorción atómica.

RESULTADOS

Inactivación del citocromo c

Como ya se mencionó en la introducción y justificación del presente trabajo, el citocromo c, a pesar de no ser una enzima presenta la capacidad de catalizar reacciones del tipo peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno y un sustrato adecuado. Al igual que las peroxidasas, el citocromo c se inactiva durante la reacción. Esta inactivación es aún más evidente cuando el citocromo se incuba con concentraciones catalíticas de H_2O_2 , en ausencia de sustrato (figura 11).

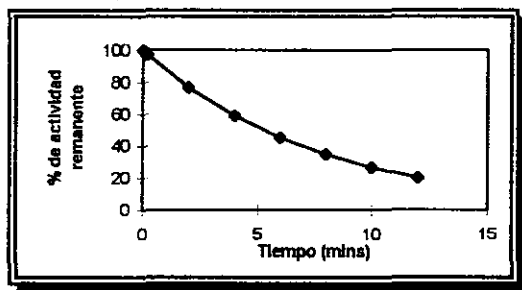


Figura 11. Inactivación del citocromo c de levadura incubado con 1 mM de H_2O_2 a temperatura ambiente (la actividad residual fue medida por medio de la oxidación de cloruro de pinaciano).

A partir de estos datos es posible calcular una constante aparente de inactivación que corresponde a la pendiente de la curva (figura 12), obteniéndose para el citocromo c silvestre un valor de 0.132 min^{-1} . Esta constante aparente de inactivación es proporcional a la concentración de peróxido utilizada, así entre mayor sea la concentración de H_2O_2 , mayor será su valor (figura 13), es decir, el citocromo se inactiva más rápido.

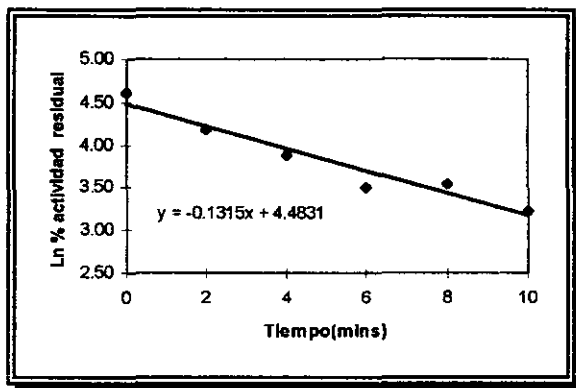


Figura 12. Cálculo de constante aparente de inactivación para el citocromo c a una concentración de H_2O_2 1 mM a temperatura ambiente.

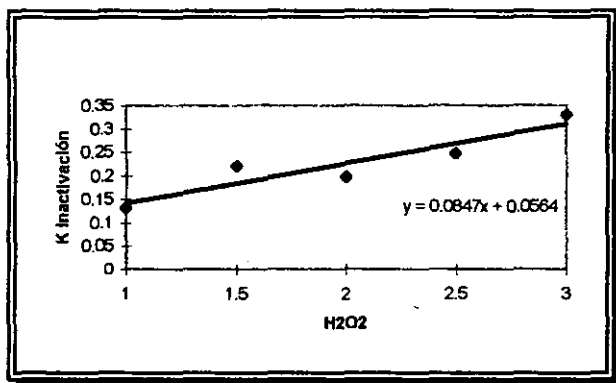


Figura 13. Constante de inactivación del citocromo c de levadura a diferentes concentraciones de H₂O₂.

La inactivación de esta proteína se ve acompañada por una disminución en la absorbancia de la banda Soret de la proteína a 408 nm (figura 14).

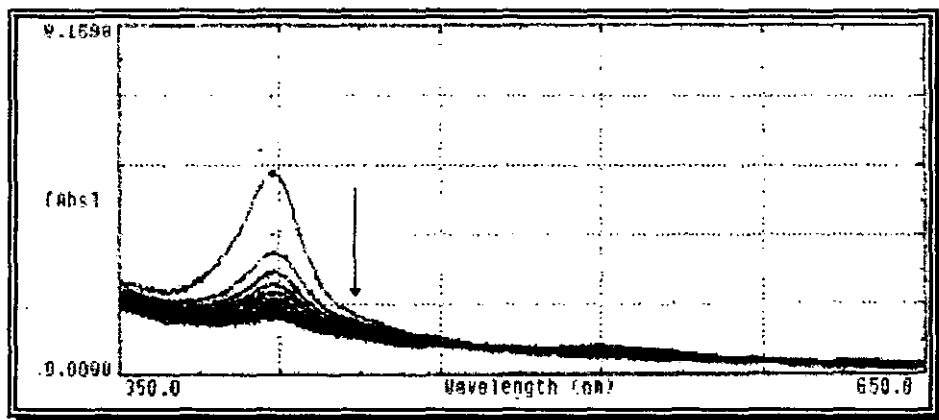


Figura 14. Cambio de la absorbancia de la banda Soret de la proteína silvestre, en presencia de H₂O₂ (se realizó una lectura cada 2 minutos, la flecha indica el cambio de patrón con respecto al tiempo).

Este hecho, conjuntamente con evidencias anteriores con respecto a la oxidación de distintas hemoproteínas como el citocromo P₄₅₀ (Guengerich, 1978 ; Schaefer, et al., 1985), y la mioglobina (Brown, 1976) y de la formación de compuestos tipo biliverdinas a partir de hemoproteínas (Jones, et al., 1973), nos hizo pensar que el proceso de inactivación estaba relacionado a una destrucción oxidativa del grupo ferroporfirina de la proteína. El siguiente paso fue entonces identificar los productos de degradación del grupo hemo para de esta manera entender la inactivación.

Análisis de metabolitos del hemo

Con el fin de establecer si esta oxidación afecta de manera directa al grupo prostético se midió la cantidad de hierro presente en la proteína, antes y después de tratarla con H_2O_2 , mediante absorción atómica, encontrándose que efectivamente un porcentaje importante de hierro (de alrededor del 63%) se libera en los primeros 10 minutos de la reacción.

Para establecer la identidad de los metabolitos producidos por dicha reacción sobre el grupo prostético se utilizaron diversos métodos de análisis (figura 15). En todos los casos, se probaron distintas estrategias para recuperar las muestras, utilizando diferentes condiciones de extracción, distintos solventes, temperatura. Asimismo se probó derivatizar con diversos reactivos que permitieran analizar las muestras por distintos métodos. Dentro de las diferentes técnicas utilizadas se probaron varios tipos de columnas y fases (cromatografía de alto rendimiento), diferentes sistemas de solventes y reactivos de detección (cromatografía en capa fina), así como distintas técnicas de modificación (cromatografía de gases). Sin embargo no se obtuvieron resultados reproducibles que nos indicaran la presencia de algún producto de modificación derivado del grupo hemo.

El hecho de que el citocromo c, a diferencia de otras hemoproteínas, posea un grupo hemo unido covalentemente a la proteína pudo haber dificultado la extracción de cualquier producto oxidado. Así, se intentó romper los enlaces tioeter para liberar la porfirina oxidada por medio de una reacción con sulfato de plata (Fisher et al., 1973), en este caso solamente se pudo liberar el grupo hemo de la proteína silvestre sin oxidar, sin embargo, no se tuvo éxito en la detección de algún producto de la proteína oxidada.

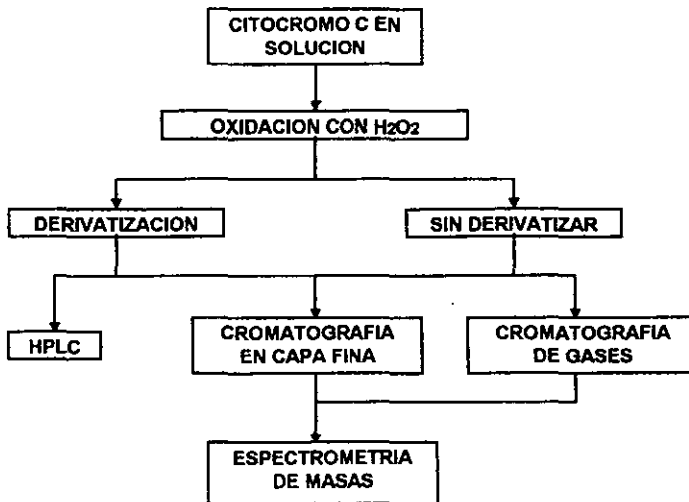


Figura 15. Estrategia general utilizada para analizar los productos de oxidación del grupo hemo.

Comparación entre la absorbancia en la banda Soret y la inactivación de la proteína.

Como puede observarse en la figura 16, cuando se compara la velocidad de desaparición del hemo con la inactivación de la proteína, bajo condiciones similares, se encuentra que ambos procesos se comportan de la misma manera, pero a una velocidad distinta. En el caso de la actividad, esta decrece más rápido que la absorbancia en la región Soret. Así por ejemplo, a los 8 minutos, prácticamente se tiene el doble (70%) de absorbancia en el hemo, comparado con la actividad (36%).

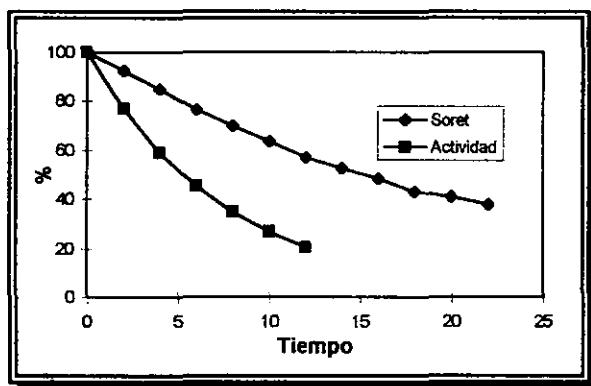


Figura 16. Comparación entre la actividad residual y la Absorbancia en la banda Soret del Citocromo c de levadura, al incubarlo con 1 mM de H_2O_2 .

Este resultado, sugería que si bien la inactivación y la desaparición del grupo hemo eran ambos provocados por la presencia del peróxido de hidrógeno, la inactivación precedía a la destrucción del hemo. Por lo anterior, se podía hipotetizar sobre algún daño sobre la cadena polipeptídica debida a la reacción con el H_2O_2 .

Diferencias en la composición de la proteína debido a la oxidación por H_2O_2 .

Con el propósito de establecer si existen sitios susceptibles de oxidación dentro de la proteína se llevó a cabo un análisis de aminoácidos de una solución de citocromo c de levadura antes y después de la reacción con peróxido de hidrógeno. En el caso de la reacción de oxidación, esta se detuvo a los 8 minutos. A continuación se muestra una gráfica (figura 17) en donde se puede observar que el contenido de aminoácidos se conserva relativamente constante, a excepción de los residuos de lisina, metionina, cisteína y tirosina, siendo éste último el cambio más significativo, ya que estos residuos prácticamente desaparecen después del proceso de oxidación con peróxido de hidrógeno.

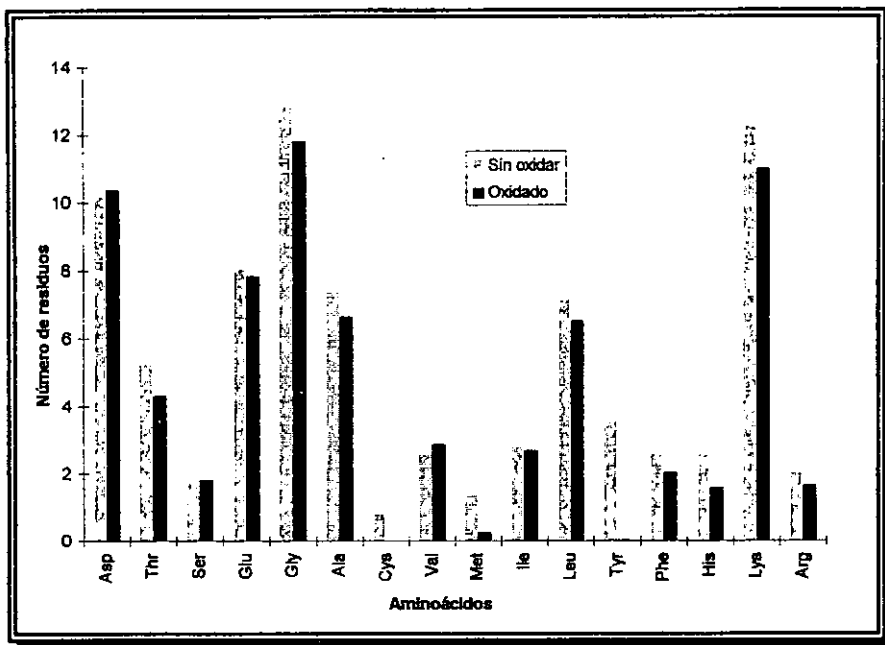


Figura 17. Cambio en el contenido de aminoácidos del citocromo c después de 8 minutos de la reacción de oxidación con 1 mM de H₂O₂.

Con base en estos resultados y a reportes anteriores de la formación de radicales libres en aminoácidos de tirosina dentro de la estructura del citocromo (Deterding, et al., 1998), se propuso construir una mutante de citocromo c en la cual se substituyeran todas las tirosinas por fenilalaninas, con el fin de mejorar la estabilidad de la proteína a la acción del peróxido de hidrógeno.

Variante Y-

Para sustituir todos los residuos de tirosina en el citocromo c de levadura, se decidió utilizar una técnica de PCR que implica varios pasos de amplificación (Villaruel and Regalado, 1997). De estos residuos, los que corresponden a las posiciones 74 y 97, se encuentran localizados en la superficie de la proteína, mientras que los residuos 46,48 y 67, están más cercanos al grupo hemo (67) y a su cavidad (46 y 48).

Después de identificar todas las mutaciones por secuencia, se procedió a la purificación de la proteína y al ensayo de su estabilidad, resultando esta muy similar a la de la proteína silvestre (figura 18) con una constante aparente de inactivación de 0.1139 min⁻¹ (a una concentración de 1 mM de H₂O₂).

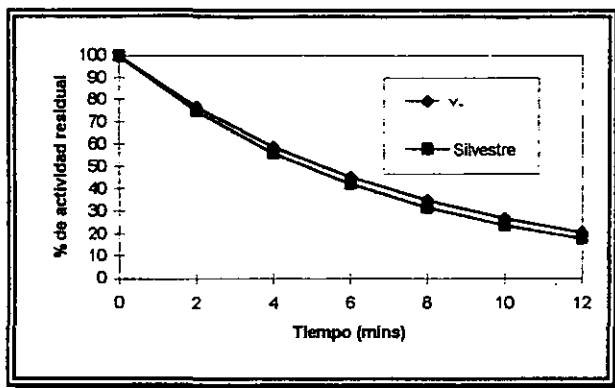


Figura 18. Estabilidad de la variante Y- (sin tirosinas) a 1 mM de H₂O₂.

Análisis de distintas variantes de citocromo c

Por otro lado, debido a que en el laboratorio se contaba con distintas variantes de citocromo c de levadura que fueron construidas para estudiar la transferencia de electrones (Mauk, et al., 1997), se decidió determinar su constante de estabilidad aparente hacia el peróxido con el fin de relacionar esta característica con diferencias en la estructura de la proteína obtenidas por modelamiento.

Como se observa en la tabla V, a una concentración de 1 mM de H₂O₂, las mutaciones F82A, K72A y K79A mostraron constantes aparentes más grandes que para el caso de la proteína silvestre. Por el contrario, las variantes K73A, K87A, N52I, poseen una constante aparente de inactivación significativamente más pequeña. En el caso de la variante Y67F, el valor de su constante a 1 mM de H₂O₂ es casi igual al de la proteína silvestre, sin embargo, es menos sensible al incremento en la concentración del peróxido (figura 19) presentando la pendiente un valor muy cercano a cero (tabla VI). Una vez establecidas estas mutaciones, se utilizaron varios programas de modelamiento para simularlas y así intentar encontrar información estructural que pudiera estar relacionada con las características de estabilidad. Sin embargo, y de acuerdo a los criterios que se utilizaron, como el cambio en la distancia entre los aminoácidos cercanos al grupo hemo, la conformación general de la proteína, o la posición y las características de los aminoácidos mutados, no se pudieron encontrar características comunes entre variantes de comportamiento similar.

Tabla V. Constantes aparentes de inactivación ($K = \text{min}^{-1}$) de distintas variantes de citocromo c.

H ₂ O ₂ (mM)	F82A	K72A	K79A	WT	526780	K73A	K87A	Y67F	N52I
1.0	0.347	0.216	0.228	0.132	0.146	0.068	0.084	0.149	0.060
1.5	0.486	0.283	0.306	0.221	0.156	0.157	0.072	0.166	-----
2.0	0.482	0.370	0.464	0.200	0.223	0.167	0.085	0.143	0.095
2.5	0.716	0.285	0.486	0.247	0.226	0.194	-----	-----	0.094
3.0	1.036	0.445	-----	0.333	0.277	0.192	0.186	0.183	0.110

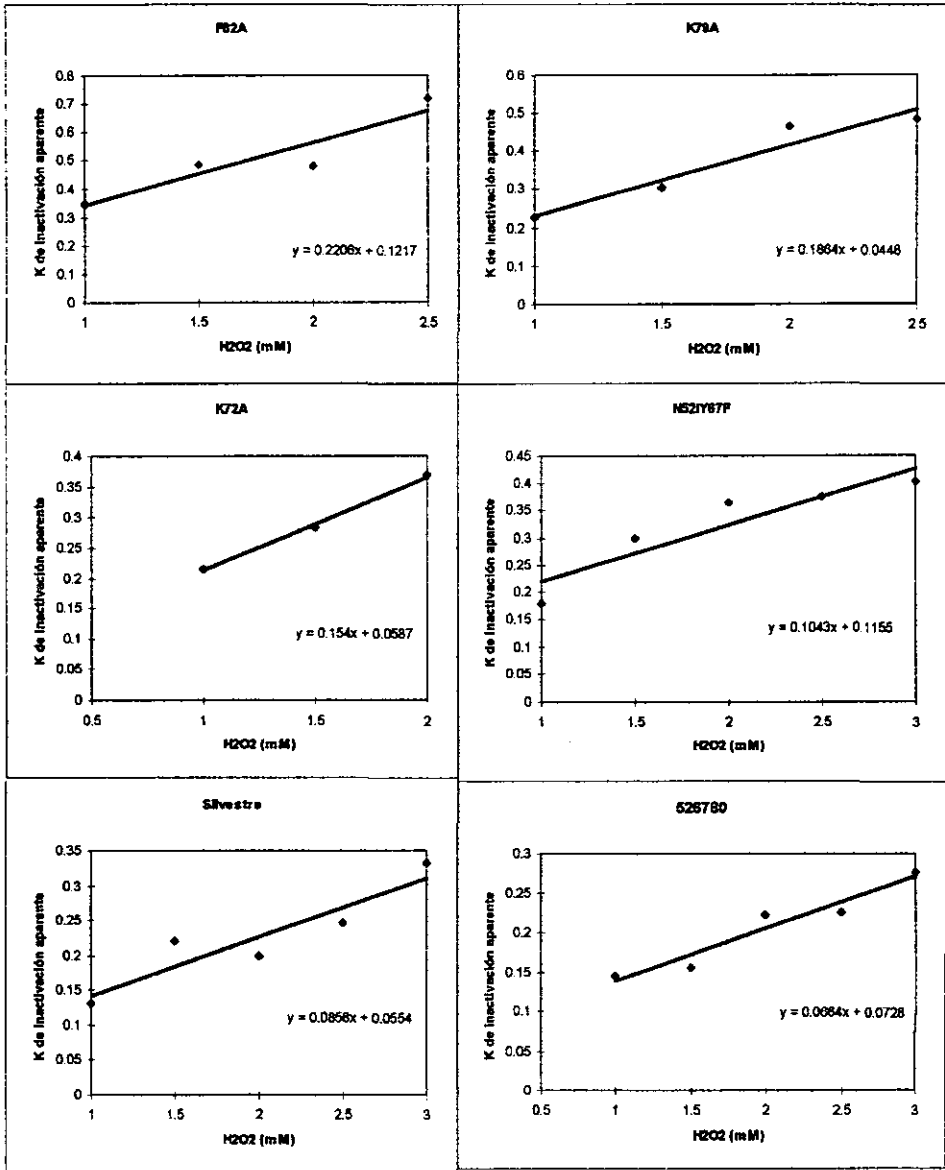


Figura 19. Relación entre la k de inactivación aparente y la concentración de H₂O₂ para las distintas variantes analizadas.

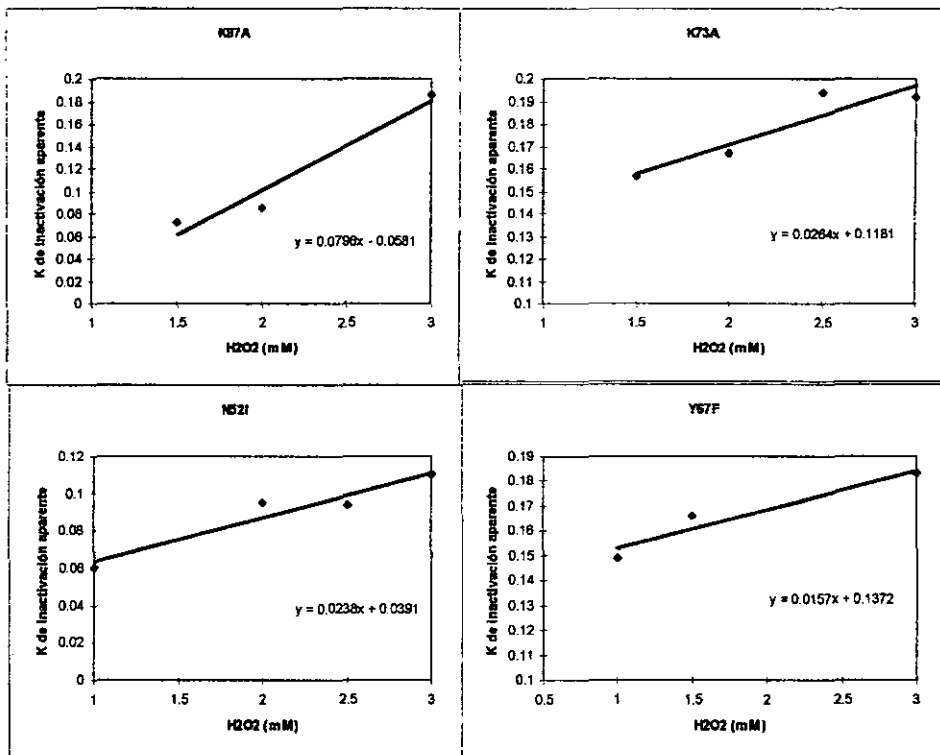


Figura 19 (cont.) Relación entre la k de inactivación aparente y la concentración de H₂O₂ para las distintas variantes analizadas.

Tabla VI. Valor de la pendiente de la gráfica de la constante aparente de inactivación en función de la concentración de peróxido de hidrógeno.

Variante	Valor de la pendiente
F82A	0.226
K79A	0.186
K72A	0.154
N52IY67F	0.104
Silvestre	0.086
526780	0.066
K87A	0.081
K73A	0.026
N52I	0.024
Y67F	0.016

En base a los resultados anteriores, se decidió construir una mutante que combinara dos mutaciones que fueran significativamente más estables al peróxido de hidrógeno en una misma proteína, esperando un efecto aditivo entre dichas mutaciones y de esa manera obtener una variante más estable que la proteína silvestre. Se escogieron las variante Y67F y N52I debido a que están cercanas entre si dentro de la estructura de la proteína, formando parte de una red de puentes de hidrógeno que se ha observado que puede influir en el potencial de oxido reducción de la proteína. (Berghius, et al., 1994).

Para construir esta mutación se partió de la mutante N52I/Y67F/M80A (526780), y mediante un oligo mutagénico, se restituyó la metionina 80, uno de los ligandos naturales del hierro en la proteína silvestre. Debido a que se utilizó esta técnica de mutagénesis sitio específica, en la cual generalmente se obtiene una gran cantidad de colonias silvestres, por la baja eficiencia de la reacción de mutagénesis, resultaba necesario un método eficiente para identificar las colonias recombinantes. De esta manera, mediante el mismo oligo que se usó para obtener la mutación, se suprimió un sitio de restricción, y usando una reacción de PCR con dos oligos externos, se amplificó la región del gen del citocromo c, directamente de las colonias obtenidas después de la mutagénesis (figura 9). Esto nos permitió identificar a las colonias mutantes después de digerirlas con una enzima de restricción, como se observa en la figura 20. Una vez identificada la colonia, por la ausencia del sitio de restricción para KpnI y confirmada mediante su secuencia nucleotídica, se procedió a expresar y purificar a la proteína mutante.

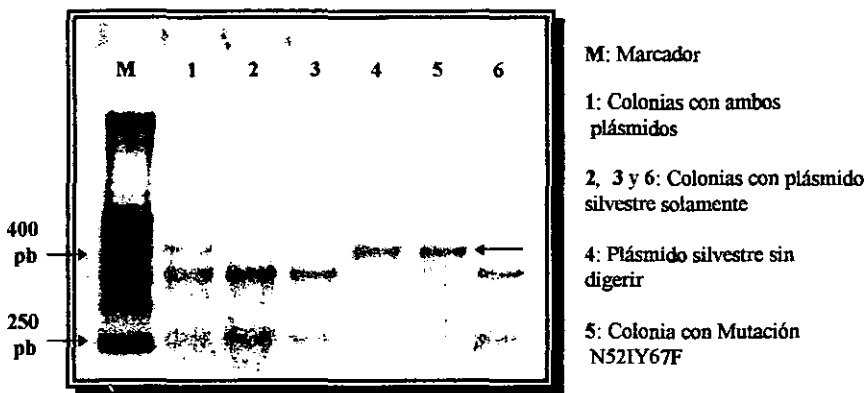


Figura 20. Gel de agarosa para identificar mutante I52F67.

El protocolo de purificación fue el mismo descrito anteriormente, sin embargo, en este caso el paso definitivo de purificación fue utilizando la cromatografía líquida de alta resolución con una columna de intercambio catiónico débil de carboximetil celulosa. En la figura 21 se observa el pico principal del citocromo c, el cual fue identificado por su patrón de absorbancia en función de la longitud de onda.

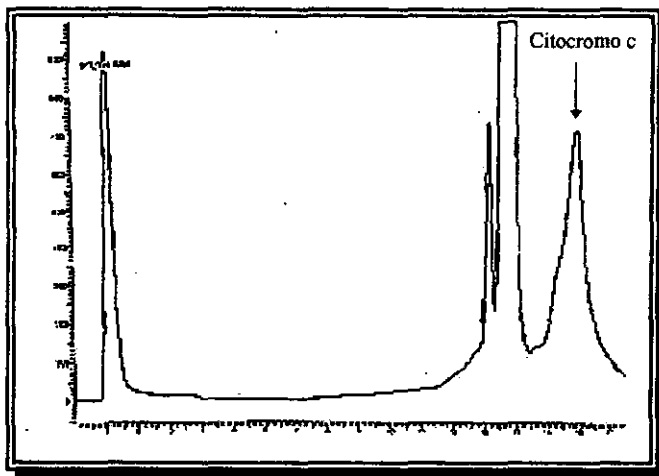


Figura 21. Cromatograma de purificación de la proteína mutante N52I/Y67F, en una columna de CMC eluida utilizando un gradiente de NaCl en buffer de fosfatos pH 6.0.

Después de determinar la estabilidad de la variante, ésta resultó ser menos estable inclusive que la proteína silvestre cuando se compara a una misma concentración de peróxido de hidrógeno (Tabla VII) o con la influencia de esta concentración sobre la constante aparente (Tabla VI).

Tabla VII. Comparación entre las constantes aparentes (min^{-1}) de las proteínas silvestre y mutante N52I/Y67F.

H_2O_2 (mM)	WT	N52I/Y67F
1.0	0.132	0.179
1.5	0.221	0.299
2.0	0.200	0.365
2.5	0.247	0.375
3.0	0.333	0.405

Ahora bien, lo que resulta interesante de esta mutante es el hecho de que cuando se analiza su comportamiento en la región Soret, se observa una diferencia significativa con respecto a la proteína silvestre. En un lapso de 22 minutos se obtiene solo una reducción de la absorbancia de alrededor del 10 % (figura 22), mientras que la proteína silvestre, ya ha perdido alrededor del 82% de absorbancia en la región Soret (figura 14).

Esto se aprecia más claramente en la figura 23, una gráfica en la que se compara la velocidad de desaparición de la absorbancia en la banda Soret de las distintas variantes de citocromo c cuando se incuban con H_2O_2 a una concentración de 1 mM de peróxido de hidrógeno. Al intentar correlacionar la velocidad de disminución de la absorbancia con la estabilidad de cada mutante, no se encontró una relación consistente, ya que por ejemplo en el caso de la mutante N52I, que es una de las más estables de acuerdo a los datos de la tabla

VI, su absorbancia del grupo hemo disminuye más rápidamente que para el caso de las mutaciones Y67F y 526780. En el otro extremo, en la mutante K72A disminuye la absorbancia en la banda Soret a una velocidad similar a la de la mutante F82A, a pesar de que la primera es mas estable que la segunda, de hecho, la mutación F82A fue la variante más inestable de todas la analizadas.

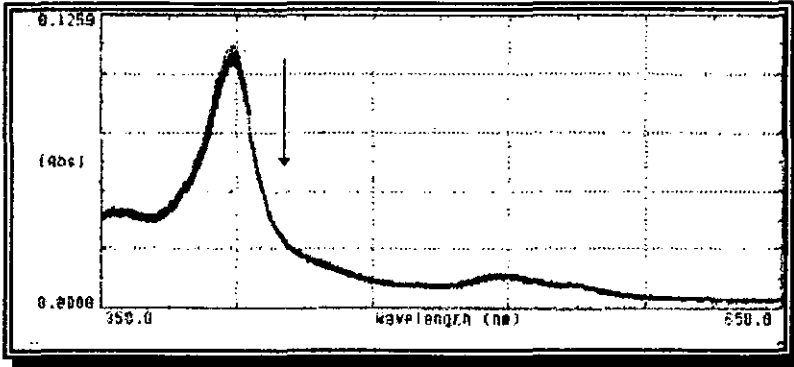


Figura 22. Cambio de la absorbancia de la banda Soret de la variante N52I/Y67F, en 1mM de H₂O₂ (Se realizó una lectura cada 2 minutos, la flecha indica el cambio en la absorbancia en función del tiempo).

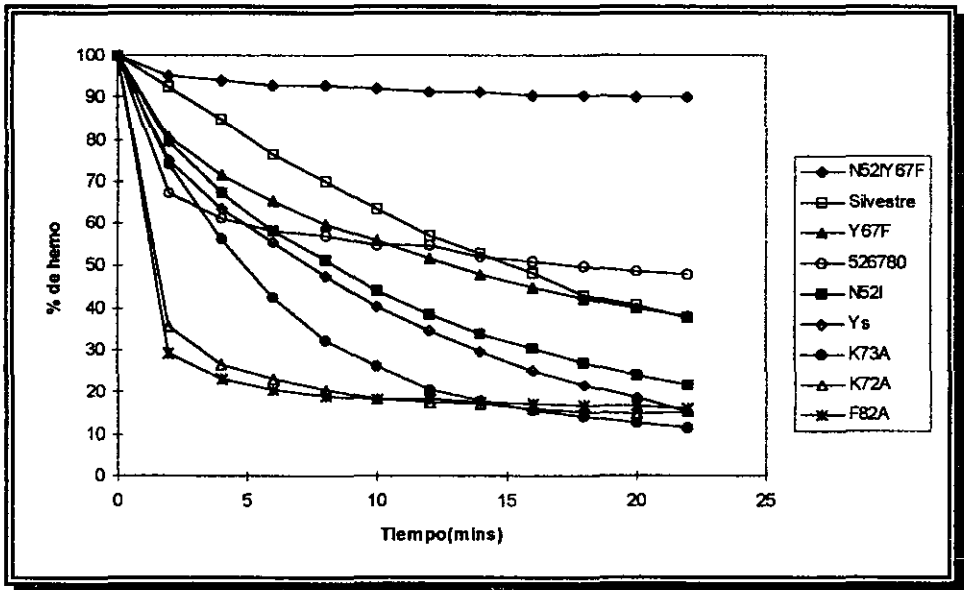


Figura 23. Gráfica de absorción en la banda Soret con respecto al tiempo de distintas variantes de citocromo c, incubadas con H₂O₂ 1mM.

Discusión

El citocromo c es capaz de catalizar la oxidación de compuestos polinucleoarómicos (Torres et al., 1995) de la misma manera que lo hacen enzimas como la lignino peroxidasa (Sanglar et al., 1986 ; Vazquez-Duhalt et al., 1994), la manganeso peroxidasa (Bogan and Lamar, 1995) y los citocromo P450 (Anzenbacher et al., 1996). Sin embargo, al igual que estas enzimas, sufre una reacción al utilizar peróxido de hidrógeno como sustrato (Chung and Aust, 1995; Wariishi, et al, 1991; Mylrajan, et al., 1990 ; Cai and Tien, 1992). En mediciones realizadas en el laboratorio se encontraron las constantes de inactivación para un número de hemoproteínas y peroxidasa a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (tabla VIII). Del análisis de estos resultados, se concluye que las peroxidasa son generalmente más estables a la presencia del H₂O₂ que el citocromo. Sin embargo, las estabildades del citocromo c de levadura son similares a las presentadas por la ligninoperoxidasa.

Tabla VIII. Constantes de inactivación ($k=\text{min}^{-1}$) de diferentes hemoproteínas a distintas concentraciones de H₂O₂.

Concentración de H ₂ O ₂ (mM)	Cloroperoxidasa	Peroxidasa de rabano blanco	Lactoperoxidasa	Ligninoperoxidasa
1	0.4492		0.0285	
2				0.1175
3	0.5027			
4				0.1201
6	0.7268			
8				0.1991
9	0.7371			
10		0.0529	0.0332	
12	0.8701			0.2868
15	0.7717	0.0476		
16				0.4393
20		0.0733	0.0414	
30		0.2114	0.0575	
40		0.3524		

En el caso del citocromo c, la inactivación se presenta en ausencia de cualquier catalizador usando como concentración mínima de peróxido de hidrógeno 1 mM (figura 11). Utilizando los datos de inactivación, se calculó una constante aparente de inactivación ($K=\text{min}^{-1}$), la cual varía con la concentración de peróxido de hidrógeno (figura 13).

Este proceso se ve acompañado por una disminución en la absorbancia de la banda Soret de la proteína (figura 14). Un comportamiento similar se puede observar con otros citocromos tipo c, como el de corazón de caballo (datos no mostrados). Wariishi y colaboradores (1994) reportaron en un trabajo previo la necesidad de la presencia de ligninoperoxidasa para llevar a cabo la oxidación del citocromo c de corazón de caballo con H₂O₂. Esta discrepancia seguramente se debe a que en el trabajo en cuestión se utilizaron

concentraciones de peróxido cercanas a las fisiológicas (del orden de 0.1 mM), las cuales son más bajas que las que se usaron en este trabajo (tabla V).

De estos resultados así como de antecedentes en donde se reportaba acerca de los productos de oxidación del citocromo P₄₅₀ (Guengerich, 1978 ; Schaefer, et al., 1985) y de la formación de compuestos tipo biliverdinas a partir de hemoproteínas (Jones, et al., 1973), se originó el presente trabajo. En especial se consideró el trabajo de Brown (1976) con la mioglobina, en donde se proponía el efecto protector de los aminoácidos localizados cerca de los grupos metileno contra la degradación oxidativa por el H₂O₂. Todas estas evidencias soportaban la idea de que por medio de mutaciones sitio específicas se podía modificar la estructura de la proteína alrededor del grupo hemo con el fin de mejorar su estabilidad a la inactivación por H₂O₂. De esta manera, el mecanismo de inactivación propuesto (Vazquez-Duhalt, 1998), del cual se partía se encuentra esquematizado en la figura 24.

En este modelo, el ciclo principal es el mismo que se ha propuesto para las peroxidases (figura 5), pasando por el Compuesto I y el Compuesto II hasta regresar al estado inicial. Sin embargo, además de este ciclo se plantea la formación del compuesto III, un radical peroxilo. Este compuesto debido a su alta reactividad, alternativamente puede seguir dos posibles caminos, el primero es la oxidación de un compuesto polinucleoaromático para regresar a la enzima a su estado basal. El segundo es una reacción de inactivación que implica la ruptura del grupo hemo, obteniéndose un compuesto similar a las biliverdinas (compuesto III*).

En base a todo lo anterior, el primer paso fue establecer si esta oxidación afectaba directamente al grupo prostético llevándose a cabo una serie de análisis para identificar los productos de oxidación de dicho grupo. Al analizar la cantidad de hierro remanente en la proteína después de la oxidación con peróxido de hidrógeno, se encontró que dicho elemento se libera significativamente de la proteína después de la reacción por lo que es posible afirmar que el efecto visto en la figura 14 no es solamente un cambio en el estado de oxidación de la proteína o un reordenamiento de los aminoácidos en el entorno del hemo.

Ahora bien, la identificación de los metabolitos de dicho grupo por medio de diferentes técnicas no ha sido posible hasta ahora. Esta ausencia de productos pudo deberse a la dificultad que presenta el análisis de los productos de oxidación del citocromo c, ya que su grupo hemo se encuentra unido covalentemente a dos cisteínas. Sin embargo, también puede sugerir varias alternativas, la primera de ellas, que la reacción no implica la fragmentación del grupo hemo, como en el caso del citocromo P₄₅₀ (Schaefer, et al., 1985), por lo que no se liberan di y monopirroles producto de la oxidación. Otra posibilidad denotaría que si bien existe una oxidación, los productos permanecen unidos a la cadena polipeptídica en vez de liberarse. Existe un ejemplo de este último caso en el que el grupo hemo de la mioglobina se une covalentemente con un residuo de tirosina después de que la proteína es oxidada con peróxido de hidrógeno (Catalano, et al., 1989). Esto explicaría el porque no se pudo obtener algún metabolito inclusive después de tratar la proteína oxidada con sulfato de plata para romper los enlaces tioeter, ya que el hemo permanecería unido ahora mediante un enlace covalente distinto.

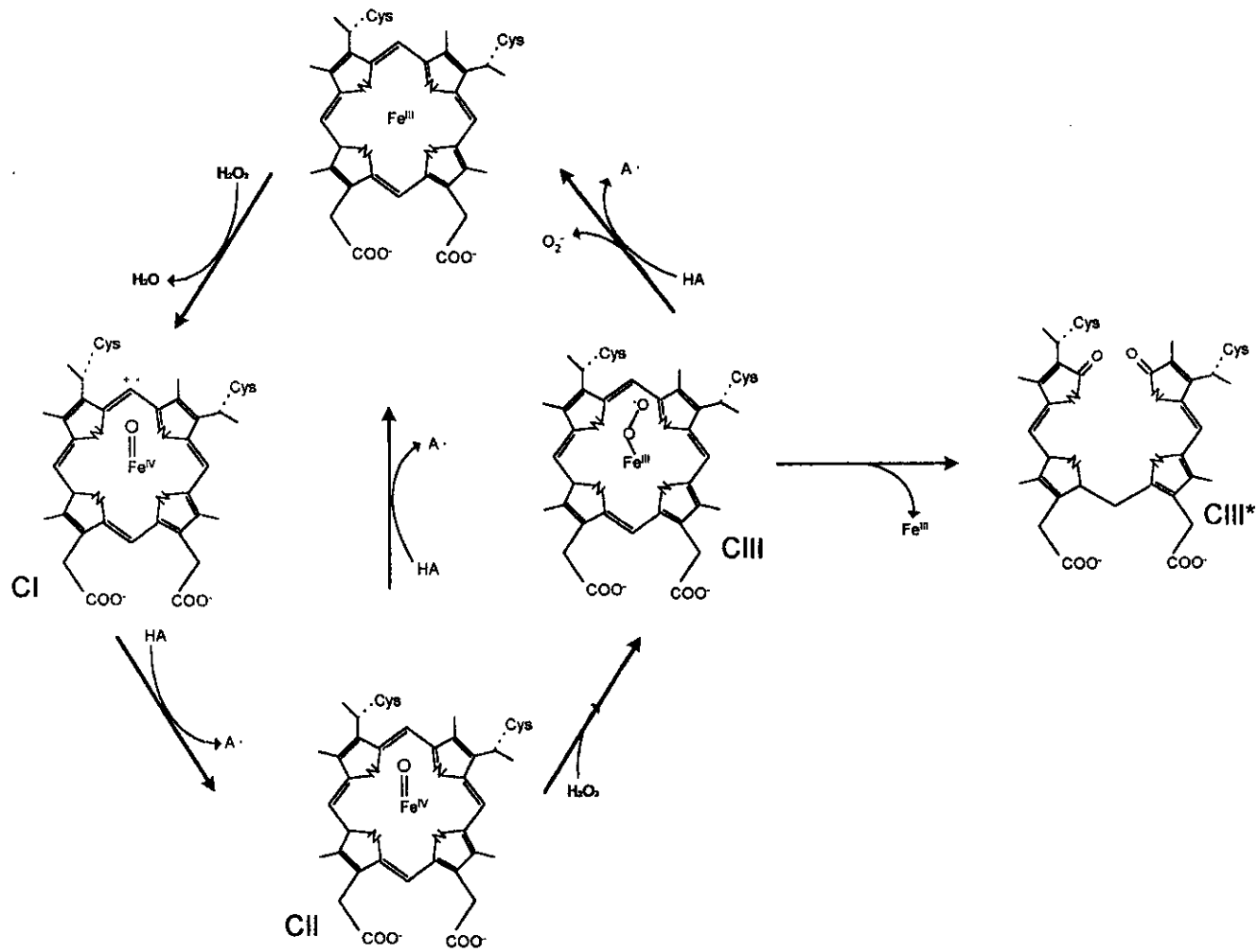


Figura 24. Mecanismo de inactivación inicialmente propuesto para el citocromo c en presencia de peróxido de hidrógeno.

Al comparar ambos procesos, es decir, la inactivación de la proteína y la desaparición del grupo hemo (figura 16), es posible observar que a pesar de que se comportan de manera similar, poseen una velocidad distinta. Esto nuevamente está en contraposición con el mecanismo para algunas peroxidases y citocromos, en donde se plantea que la inactivación es debida directamente a la destrucción del grupo hemo.

El hecho de que los residuos de tirosina prácticamente desaparezcan después de la reacción con peróxido de hidrógeno indica que de alguna manera estos aminoácidos pueden estar involucrados en el proceso de inactivación. Existen reportes que confirman estos resultados, ya que se ha establecido que el citocromo c es capaz de formar dímeros de proteína a través de la producción de radicales libres de tirosina por acción del peróxido de hidrógeno (Deterding, et al., 1998). De manera que los radicales de tirosina podrían ser los responsables de la inactivación, ya sea formando dímeros de la proteína o reaccionando intramolecularmente para producir una proteína incapaz de llevar a cabo la catálisis. Esto último se ha propuesto para el caso de la mioglobina, en la cual, su grupo hemo que no está unido covalentemente, se une a la proteína gracias a la formación de un radical libre de tirosina (Wilks and Montellano, 1992).

Sin embargo, al construir una variante que carecía de tirosinas (Y-), se encontró que se inactiva de manera similar a la proteína silvestre (figura 18). Una de las posibles razones para explicar este comportamiento, se encuentra en el hecho de que las tirosinas fueron substituidas por fenilalaninas, con el fin de no perturbar demasiado la estructura de la proteína, siendo posible que este aminoácido sea capaz también de formar radicales libres que puedan intervenir en el proceso de inactivación.

Ahora bien, debido a que los residuos de fenilalanina permanecen prácticamente constantes después de la oxidación de la proteína silvestre con peróxido de hidrógeno (figura 17), se puede pensar que en ausencia de tirosinas se forma un radical libre en alguna fenilalanina y éste a su vez es transferido hacia otro grupo dentro de la proteína el cual finalmente produce la inactivación.

Como estrategia alternativa al enfoque anterior, se planteó determinar la estabilidad de diversas variantes de citocromo c e intentar inferir en base al análisis de la estructura de variantes más o menos estables, algunas características que nos permitieran mejorar la estabilidad de la proteína. Desafortunadamente, en base a los criterios que utilizamos, no pudimos encontrar una característica común entre estas proteínas, a pesar de que observamos mutaciones significativamente más estables y también algunas muy inestables (tablas V y VI).

Si el mecanismo planteado en la figura 24 es válido para el citocromo c, su sitio activo debería presentar una serie de características estructurales comunes a las hemoperoxidasas. Entre las más importantes se pueden mencionar la presencia de un puente de hidrógeno entre el nitrógeno de la Histidina 176 (para el caso de la ligninoperoxidasa) que funciona como ligante proximal de un hierro pentacoordinado y el oxígeno de el Ácido Aspártico 238, altamente conservado en esta clase de enzimas (Banci, 1997). Además de estos dos residuos, se encuentra también del lado proximal la Fenilalanina 193. Del otro extremo, del sitio distal, se encuentran dos residuos de carácter básico, la Histidina 47 y la Arginina 43 que conjuntamente con la Fenilalanina 46 y una red de puentes de hidrógeno tienen como función favorecer y estabilizar la formación del Compuesto 1 (Smith and

Veitch, 1998). En el caso del citocromo c resulta difícil establecer el sitio de formación del Compuesto I a partir de la estructura de la proteína, asumiendo que el mecanismo de catálisis sea similar. El citocromo c también posee una histidina, (His 19) como ligante del hierro, la cual también forma un puente de hidrógeno pero en este caso con el oxígeno de la prolina 30. En el extremo de la Metionina 80, existen varios residuos cargados, como es el caso de las lisinas 72 y 79 así como la Tirosina 67, además se encuentra muy cerca una fenilalanina, correspondiente a la posición 82. Sin embargo, no se puede afirmar con certeza la posibilidad de que el Compuesto I se forme de este lado.

Una característica estructural muy importante del citocromo c, es la presencia de una red de puentes de hidrógeno que involucra a los residuos Asparagina 52, Tirosina 67 y Treonina 78, además de algunas moléculas de agua, en especial al agua denominada 166 (Berghuis et al., 1994). Las interacciones constituidas por estos residuos, pueden influir en el potencial redox de la proteína mediante la modificación de la flexibilidad de distintos segmentos de la proteína (Langen, et al., 1992) y a través del cambio en el patrón de transferencia de electrones dentro de la misma.

De los datos de la tabla V, es posible observar que las mutantes individuales Y67F y N52I presentan por separado una constante aparente de inactivación menor que para el caso de la proteína silvestre. Además de que esta constante se ve influenciada en menor medida por el aumento de la concentración de peróxido de hidrógeno (figura 19 y tabla VI). De esta manera, considerando estos datos y la posible función de estos residuos en la proteína, se propuso la mutación N52I/Y67F esperando un efecto aditivo de estas mutaciones en la estabilidad. Contrariamente, esta variante resultó más inestable inclusive que la proteína silvestre (tabla VII). Este efecto no es tan sorprendente ya que existen diversos ejemplos en los que los efectos de mutaciones puntuales no resultan aditivas (Abrahmsen, et al., 1991; Chen and Arnold, 1991), esto debido a que todavía no se comprende completamente las interacciones entre aminoácidos que permitan predecir el comportamiento de una mutación.

A pesar de esto, al analizar el proceso de disminución de la absorbancia en la región Soret de esta mutante, encontramos que ésta disminuye de manera mucho más lenta, cuando se compara con la proteína nativa y contra el resto de las mutantes ensayadas (figura 23). Esto en cierta medida corrobora nuestra afirmación en el sentido de que ambos procesos, tanto la desaparición del hemo como la inactivación, son fenómenos distintos, ya que obtuvimos una mutación en la que pese a ser más inestable, el cambio en la absorbancia del grupo hemo es muy pequeño en un periodo de tiempo determinado. Esto a su vez, nos permitiría inferir que el mecanismo sugerido en un principio para la inactivación de la proteína, es distinto al que se ha propuesto para las peroxidasas, no obstante que el ciclo catalítico pudiera ser el mismo. De esta manera, aún queda por esclarecer cual es exactamente la reacción de inactivación de esta proteína. Sin embargo dicha mutación constituye un punto de partida muy importante, ya que en ella prácticamente se han disociado ambos efectos.

Con la información obtenida en el presente trabajo podemos proponer que dentro del mecanismo de inactivación en ausencia de sustrato se forma un radical derivado del hemo de la proteína (figura 25), sin embargo este radical es transferido a través de distintos aminoácidos susceptibles de oxidación, hasta que finalmente se alcanza un residuo cuya oxidación impide la actividad catalítica de la proteína. Dentro de este proceso de transferencia de electrones, juega un papel fundamental la red de puentes de hidrógeno

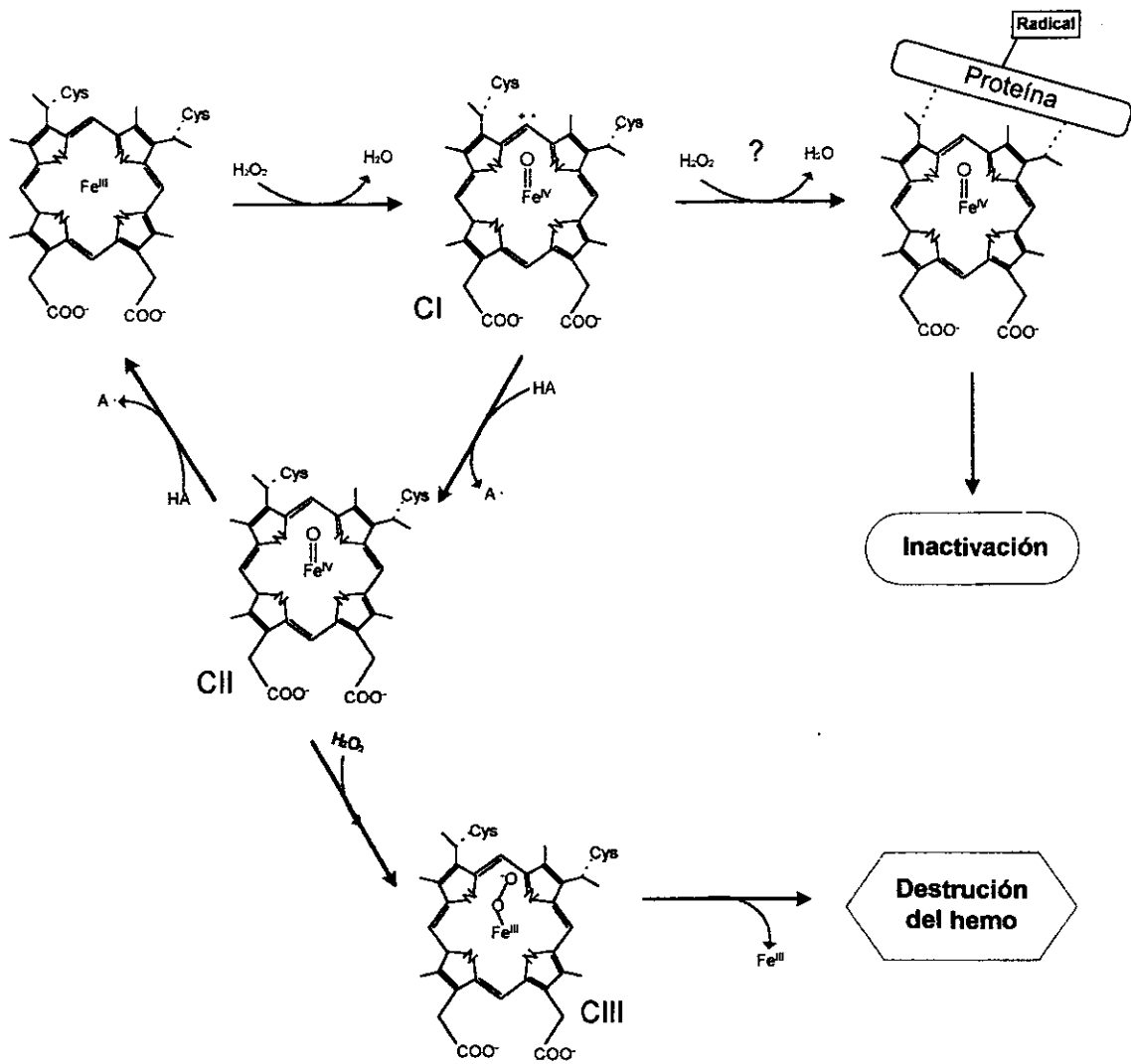


Figura 25. Posible mecanismo de inactivación del citocromo c considerando los resultados de este trabajo

conformada por los residuos 52, 67 y 78, la cual fue modificada con las mutaciones introducidas.

Paralelamente a este proceso de inactivación, pero a una velocidad mucho más lenta, en presencia de peróxido el hemo es oxidado, observándose un decremento de la absorbancia en la región Soret.

Conclusiones

Las conclusiones de este trabajo, se resumen a continuación.

- El iso-1-citocromo c de levadura se inactiva al igual que todas las peroxidasas por la presencia de H_2O_2 y la ausencia de sustrato.
- La inactivación está acompañada de la destrucción del grupo prostético hemo.
- El o los productos de dicha destrucción, no son del tipo biliverdinas.
- Podemos afirmar que la inactivación del citocromo c de levadura, y probablemente de otros citocromos se debe en primera instancia a la oxidación de un residuo esencial para la catálisis y que este proceso precede a la destrucción del hemo.
- Por medio de mutagénesis sitio específica es posible incrementar la estabilidad de la proteína.
- Las mutaciones de los residuos 52, 67 y 102 produjo una variante en donde el grupo prostético no es afectado por la presencia de H_2O_2 , aún cuando esta variante pierde su actividad.
- Ahora se cuenta con una variante en la cual la destrucción del grupo prostético hemo ha sido significativamente reducida, lo que implica tener una proteína ideal para el estudio del proceso de inactivación a la oxidación de residuos de aminoácidos en presencia de H_2O_2 .

conformada por los residuos 52, 67 y 78, la cual fue modificada con las mutaciones introducidas.

Paralelamente a este proceso de inactivación, pero a una velocidad mucho más lenta, en presencia de peróxido el hemo es oxidado, observándose un decremento de la absorbancia en la región Soret.

Conclusiones

Las conclusiones de este trabajo, se resumen a continuación.

- El iso-1-citocromo c de levadura se inactiva al igual que todas las peroxidasas por la presencia de H_2O_2 y la ausencia de sustrato.
- La inactivación está acompañada de la destrucción del grupo prostético hemo.
- El o los productos de dicha destrucción, no son del tipo biliverdinas.
- Podemos afirmar que la inactivación del citocromo c de levadura, y probablemente de otros citocromos se debe en primera instancia a la oxidación de un residuo esencial para la catálisis y que este proceso precede a la destrucción del hemo.
- Por medio de mutagénesis sitio específica es posible incrementar la estabilidad de la proteína.
- Las mutaciones de los residuos 52, 67 y 102 produjo una variante en donde el grupo prostético no es afectado por la presencia de H_2O_2 , aún cuando esta variante pierde su actividad.
- Ahora se cuenta con una variante en la cual la destrucción del grupo prostético hemo ha sido significativamente reducida, lo que implica tener una proteína ideal para el estudio del proceso de inactivación a la oxidación de residuos de aminoácidos en presencia de H_2O_2 .

Perspectivas

Las perspectivas de este trabajo son bastante amplias ya que aún quedan varios puntos por resolver.

En primer lugar, es necesario establecer exactamente el o los residuos esenciales para que el citocromo c, conjuntamente con su grupo hemo, pueda llevar a cabo su reacción catalítica. Si bien en este trabajo se delinearon algunos, como las tirosinas, aún no se ha establecido claramente el mecanismo de inactivación. La identificación de estos residuos permitirá proponer una estrategia más concreta para mejorar la estabilidad química de la proteína. Una manera de abordar este problema sería continuar con el análisis de mutantes específicos cuyos residuos sean susceptibles de oxidación. Un punto importante consiste en utilizar técnicas alternativas al análisis de aminoácidos, que faciliten la identificación de los productos oxidados en la proteína después de la reacción con H_2O_2 . Esto debido a que existen algunos aminoácidos que pudieran ser esenciales en este proceso, pero que no se pueden analizar utilizando una hidrólisis, tal es el caso del triptofano. De hecho, existe un solo residuo de este tipo en el citocromo c de levadura, y se ha demostrado que además de encontrarse altamente conservado en diversos citocromos, puede resultar importante en la estabilidad y en su capacidad de transferencia de electrones (Caffey and Cusanovich, 1993). Otro aminoácido que podría estar involucrado es la metiona ya que en el análisis de aminoácidos también sufrió una reducción significativa después de la oxidación.

Otra estrategia importante sería el no mutar todos los residuos de tirosina a la vez, sino uno por uno o bien cambiándolos por aminoácidos que no modifiquen drásticamente la estructura de la proteína, y que no sean tan susceptibles a la oxidación con H_2O_2 .

La variante N52IY67F se puede establecer como punto de partida en la búsqueda de mutantes más estables de citocromo c de levadura, ya que a partir de ésta, se pueden llevar a cabo modificaciones de aminoácidos hasta que se identifiquen aquellos residuos que están involucrados específicamente en este proceso y en base a esto explicar el comportamiento de las diversas mutaciones cuando reaccionan con H_2O_2 .

Finalmente, una vez esclarecido el mecanismo de inactivación sería necesario llevar a cabo un análisis cinético más detallado tanto de la inactivación como de la oxidación catalizada por esta proteína, con el fin de complementar el estudio de este proceso.

Referencias

Abrahmsen, J.T., Burnier, J., Butche, A., Kossiakoff, A., Wells, J.A. (1991) Engineering and Its Substrates for Efficient Ligation of Peptide Bonds in Aqueous Solutions. *Biochemistry* 30 : 4151-4159.

Akasaka, R., Mashino, T., Hirobe, M. (1994) Cytochrome P450-like Substrate Oxidation Catalized by Cytochrome c and Immobilized Cytochrome c. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 301 (2): 355-360.

Anzenbacher, P., Niwa, T., Tolbert, L.M., Sirimanne, S.R., Guengerich, F.P. (1996) Oxidation of 9-Alkylanthracenes by Cytochrome P450 2B1, Horseradish Peroxidase, and Iron Tetraphenylporphine/Iodosylbenzene Systems: Anaerobic and Aerobic Mechanisms. *Biochemistry*. 27;35(8):2512-20.

Arnao, M.B., Acosta, M., del Río, J.A., Varón, R., García-Cánovas, F. (1990) A Kinetic Study on the Suicide Inactivation of Peroxidase by Hydrogen Peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1041 : 43-47.

Aronson, H.E., Royer, W.E. and Hendrickson, W.A. (1994) Quantification of Tertiary Structural Conservation Despite Primary Sequence Drift in The Globin Fold. *Protein Science* 3, 1706-1711.

Banci, L. (1997) Structural Properties of Peroxidases. *Journal of Biotechnology*. 53 : 253-263.

Barr, D.P., Mason, R.P. (1995) Mechanism of Radical Production from Reaction of Cytochrome c with Organic Hydroperoxides. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (21): 12709-12716.

Berghius, A., Guillemette, J., McLendon, G., Sherman, F. (1994) The Role of a Conserved Water Molecule and Its Associated Hydrogen Bond Network in Cytochrome c. *Journal of Molecular Biology* 236 : 786-799.

Bogan, B.W., Lamar, R.T. (1995) One-Electron Oxidation in the Degradation of Cresote Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology*, 2631-2635.

Borman, S. (1998) Protein Progress Powwow. *Chemical and Engineering News*. August, 51-55.

Brown, J.A., Glenn, J.K., Gold, M.H. (1990) Manganese Regulate the Expression of Manganese Peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*, 173 : 3125-3130.

ESTA TESIS NO DEBE
SER REPRODUCIDA
SIN EL CONSENTIMIENTO
DE LA UNIVERSIDAD

Brown, S.B. (1976) Stereospecific Haem Cleavage. *Biochemical Journal*, 159 : 23-27.

Caffey, M.S., Cusanovich, M.A. (1993) Role of the Highly Specific Tryptophan of Cytochrome c in Stability. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 304 (1) : 205-208.

Caffey, M.S., Cusanovich, M.A. (1994) Site-specific Mutagenesis Studies of Cytochromes c. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1187, 277-288.

Cai D., Tien, M. (1992) Kinetic Studies on the Formation and Decomposition of Compounds II and III. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(16) : 11149-11155.

Cai, D., Tien, M. (1993) Lignin-degrading peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*, 30, 79-90.

Catalano, C.E., Choe, Y.S., Ortiz de Montellano, P.R. (1989) Reactions of the Protein Radical in Peroxide-treated Myoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, 18, 10534-10541.

Chapman, S.K., Daff, S. and Munro, A.W. (1997) Heme: The Most Versatile Redox Centre In Biology? *Structure and Bonding* 88, 39-70.

Chen, K, Arnold, F.H. (1991) Enzyme Engineering for Nonaqueous Solventes : Random Mutagenesis to Enhance Activity of Subtilisin E in Polar Organic Media. *Biotechnology* 9 : 1073-1077.

Chung, N., Aust, S.D., (1995) Inactivation of Lignin Peroxidase by Hydrogen Peroxide during the Oxidation of Phenols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 316 (2) : 851-855.

Churg, A.K., Warshel, A. (1986) Control of Redox Potential of Cytochrome c and Microscopic Dielectric Effects in Proteins. *Biochemistry*, 25, 1675-1681.

Das T.K., Mazumdar, S., Mitra S. (1998) Characterization of a Partially Unfolded Structure of Cytochrome c Induced by Sodium Dodecyl Sulphate and the Kinetics of its Refolding. *European Journal of Biochemistry*, 254(3):662-70.

Davies, A.M., Guillemette, J.G., Smith, M., Greenwood, C. (1993) Redesign of the Interior Hydrophilic Region of Mitochondrial Cytochrome c by Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry*, 32 : 5431-5435.

Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, J. (1997) Biochemistry and Pathology of Radical-mediated Protein Oxidation. *Biochemistry Journal*, 324 : 1-18.

Deterding, L.J., Barr, D.P., Mason, R.P., Tomer, K.B. (1998) Characterization of Cytochrome c Free Radical Reactions with Peptides by Mass Spectrometry. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (21): 12863-12869.

Dickerson, R.E. (1972) The Structure and History of An Ancient Protein. *Scientific American*, 226(4): 58-70.

Everse J, Hsia N (1997) The Toxicities of Native and Modified Hemoglobins. *Free Radical in Biology and Medicine*, 22(6):1075-99.

Everse J, Johnson MC, Marini MA (1994) Peroxidative Activities of Hemoglobin and Hemoglobin Derivatives. *Methods in Enzymology*, 231:547-61.

Everse, J. And Everse, K.E. (Eds.). (1991) *Peroxidases in Chemistry and Biology*. Vol 1 y 2. CRC Press, Boca Raton.

Ferrer, J.C., Guillemette, J.G., Bogumil, R., Inglis, S.C., Smith, M., Mauk, A.G. (1993) Identification of Lys 79 as an Iron Ligand in One Form of Alkaline Yeast Iso-1-cytochrome c. *Journal of the American Chemical Society*, 115, 7507-7508.

Fisher, W.R., Taniuchi, A. (1973) On The Role of Heme in the Formation of the Structure of Cytochrome c. *Journal of Biological Chemistry*, 248 : 3188.

Florence, T.M. (1985) The Degradation of Cytochrome C by Hydrogen Peroxide. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 23(2):131-41.

Gold, M. H., Alic, M. (1993) Molecular Biology of the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological Reviews*, 605-622.

Greene, R.M., Betz, S.F., Willis, S.H., Auld, D.S., Fenci, J.B., Pielak, G.J. (1993) Changes in Global Stability and Local Structure of Cytochrome c Upon Substituting Phenylalanine-82 with Tyrosine. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 51 : 663-676.

Gunner, M.R., Alexov, E., Torres, E. and Lipovaca, S. (1997) The Importance of the Protein In Controlling The Electrochemistry of Heme Metalloproteins: Methods of Calculation and Analysis. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2 : 126-134.

Hammel, K.E., Tien, M., et al. (1985). Mechanism of oxidative Ca-Cb cleavage of a lignin model dimer by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase : Stoichiometry and involvement of free radicals. *Journal of Biological Chemistry*, 260 : 8348-8353.

Hingen-Willis, S., Bowden, E.F., Pielak, G., (1993) Dramatic Stabilization of Ferricytochrome c Upon Reduction. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 51 : 649-653.

Hofrichter, M., Scheibner, K., Schneegab, I., Fritsche, W., (1998) Enzymatic Combustion of Aromatic and Aliphatic Compounds by Manganese Peroxidase from *Nematoloma frowardii*. Applied and Environmental Microbiology, 399-404.

Hu, Z.C., Korus, R.A., Venkataramu, C.R., Crawford, R.L. (1993) Deactivation Kinetics of Lignin Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Enzyme Microbial Technology, 15, 567-574.

Huwiler, M., Jenzer, H., Kohler, H. (1986) The Role of Compound III in Reversible and Irreversible Inactivation of Lactoperoxidase. European Journal of Biochemistry, 158 : 609-614.

Janse, B. J., Gaskell, J., Akhtar, M., Cullen, D. (1998) Expression of *Phanerochaete chrysosporium* Genes Encoding Lignin Peroxidases, Manganese Peroxidases, and Glyoxal Oxidase in Wood. Applied Environmental Microbiology, 3536-3538.

Jones, J.P., Shou, M., Korzekwa, K.R. (1995) Stereospecific activation of the procarcinogen benzo[a]pyrene: a probe for the active sites of the cytochrome P450 superfamily. Biochemistry. 30;34(21):6956-61.

Jones, P., Prudhoe, K., Robson, T. (1973) Oxidation of Deuterioferrihaem by Hydrogen Peroxide. Biochemical Journal 135 : 361-365.

Joshi, D.K., Gold, M. H. (1993) Degradation of 2, 4, 5-Trichlorophenol by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Environmental Microbiology, 1779-1785.

Kassner, R.J. (1972) Effects of Nonpolar Environments on the Redox Potentials of Heme Complexes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 69 (8): 2263-2267.

Kellner, D.G., Maves, S.A., Sligar, S.G. (1997) Engineering Cytochromes P450s for Bioremediation. Current Opinion in Biotechnology, 8: 274-278.

Kendrick, M. (1992) Metals in Biological Systems Hellis Horwood. p. 97.

Koduri, R.S., Whitman, R.E., Barr, D., Aust, S.D., Tien, M. (1996) Oxidation of 1,2,4,5-Tetramethoxybenzene by Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 326, 2

Kosen, P.A. (1992) In Stability of Protein Pharmaceuticals Part A-Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation (Ahern, T.J. and Manning, M.C., eds.), Plenum, New York, pp. 31-67.

Langen, R., Brayer, G., Berghuis, A., McLendon, G. (1992) Effect of the Asn 52—Ile Mutation on the Redox Potential of Yeast Cytochrome c. *Journal of Molecular Biology* 224 : 589-600.

Li, S., Wackett, L.P. (1993) Reductive Dehalogenation by Cytochrome P450cam : Substrate Binding and Catalysis. *Biochemistry*, 32 : 9355-9361.

Liang, N., Mauk, A.G., Pielak, G.J., (1988) Regulation of Interprotein Electron Transfer by Residue 82 of Yeast Cytochrome c. *Science*, 240, 311-313.

Mauk, A.G. and Moore, G.R. (1997) Control of Metalloprotein Redox Potentials: What Does Site-Directed Mutagenesis of Hemoproteins Tell Us?. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2, 119-125.

Mauk, A.G.(1991) Electron Transfer in Genetically Engineered Proteins. The Cytochrome c Paradigm. *Structure and Bonding*, 75, 132-154.

Michel F.C., Grulke, E.A., Reddy, C.A. (1991) Role of Manganese Peroxidases (MNP) and Lignin Peroxidases (LIP) of *Phanerochaete chrysosporium* in the Decolorization of Kraft Bleach Plant Effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* 2368-2375.

Moen, M.A., Hammel, K.E. (1994) Lipid Peroxidation by Manganese Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* is the Basis for Phenanthrene Oxidation by the Intact Fungus. *FEBS Letters*, 354 (3) : 297-300.

Munro, A.W., Lindsay, J.G. (1996) Bacterial Cytochromes P-450. *Molecular Microbiology*, 20 (6), 1115-1125.

Mus-Veteau, I., Dolla, A., Guerlesquin, F. (1992) Site-directed Mutagenesis of Tetraheme Cytochrome c3. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 : 16851-16858.

Mylrajan, M., Valli, K., Wariishi, H., Gold, M.H., Loehr, T.M. (1990). Resonance Raman Spectroscopy Characterization of Compound III of Lignin Peroxidase. *Biochemistry*, 29 : 9617-9623.

Nagy, I., Compennolle, F., Ghys, K., Vanderleyden, J., De Mot, R. (1995) A Single Cytochrome P450 System is Involved in Degradation of the Herbicides EPTC and Atrazine by *Rhodococcus sp.* Strain N186/21. *Applied Environmental Microbiology*, 61 : 2056-2060.

Orth, A.B., Royse, D.J., Tien, M. (1993) Ubiquity of Lignin-Degrading Peroxidases among Various Wood-Degrading Fungi. *Applied Environmental Microbiology*, 4017-4023.

Pelletier, H., Kraut, J. (1992) Crystal Structure of a Complex Between Electron Transfer Partners, Cytochrome c Peroxidase and Cytochrome c. *Science*, 258, 1748-1755.

Pielak, G.J., Mauk, A.G., Smith, M. (1985) Site-directed Mutagenesis of Cytochrome c Shows that an Invariant Phe is not Essential for Function. *Nature*, 313, 152-154.

Pollock, W.B., Rosell, F.I., Twitchett, M., Dumont, M., Mauk, A.G. (1998) Bacterial Expression of a Mitochondrial Cytochrome c. Trimethylation of Lys72 in Yeast Iso-1-Cytochrome c and the Alkaline Transition. *Biochemistry*, 37: 6124-6131.

Poulos, T.L. (1995) Cytochrome P450. *Current Opinion in Structural Biology*, 5: 767-774.

Radi, R., Bush, K.M., Freeman, B.A. (1993) The Role of Cytochrome C and Mitochondrial Catalase In Hydroperoxide-Induced Heart Mitochondrial Lipid Peroxidation. *Archives Biochemistry and Biophysics* 300 : 409-415.

Radi, R., Thomson, L., Rubbo, H., Prodanov, E. (1991) Cytochrome c-catalyzed Oxidation of Organic Molecules by Hydrogen Peroxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288 (1) : 112-117.

Rahimtula, A.D., O'Brien, P.J., Seifried, H.E., Jerina, D.M. The Mechanism of Action of Cytochrome P450. (1988) Occurrence of the "NIH Shift" During Hydroperoxide-dependent Aromatic Hydroxylations. *European Journal of Biochemistry*. 89 : 133-141.

Reddy, C.A. (1998) The Potential for White-Rot Fungi in the Treatment of Pollutans. *Current Opinion in Biotechnology*, 6: 320-328.

Reddy, G.V., Gelpke, M.D., Gold, M.H. (1995) Degradation of 2, 4, 6-Trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: Involment of Reductive Dechlorination. *Journal of Bacteriology*, 5159-5164.

Schaefer, W.H., Harris, T.M., Guengerich, F.P. (1985) Characterization of the Enzymatic and Nonenzymatic Peroxidative Degradation of Iron Porphyrins and Cytochrome P-450 Heme. *Biochemistry*, 24 : 3254-3263.

Schejter, A., Taler G., Navon, G., Liu, X., Margolias, E. (1996) Oxidation State-Induced Change of Iron Ligand in the Phenylalanine-82 to Histidine Mutant of Yeast Iso-1-Cytochrome c. *Journal of American Chemical Society*, 118: 477-478.

Shevelkova, A.N., Ryabov, A.D. (1996) Irreversible Inactivation of *Caldaromyces fumago* Chloroperoxidase by Hydrogen Peroxide. A Kinetic Study in Chloride and Bromide Systems. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 39(4) : 665-670.

Smith, A.T., Veitch, N.C. (1998) Substrate Binding and Catalysis in Heme Peroxidases. *Current Opinion un Chemical Biology*, 2: 269-278.

Stadtman, E.R. (1990) Covalent modification reactions are marking steps in protein turnover. *Biochemistry*, 29(27) : 6323-31.

Stolze K., Nohl H. (1995) Reactions of Reducing Xenobiotics with Oxymyoglobin. Formation of Metmyoglobin, Ferryl Myoglobin and Free Radicals: an Electron Spin Resonance and Chemiluminescence Study. *Biochemistry and Pharmacology*, 49(9):1261-7.

Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R. (1998) Chemical Modification of Cytochrome c Improves their Catalytic Properties in Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Enzyme Microbial Technology*, 22 : 8-12.

Torres, E., Sandoval, J.V., Rosell, F., Mauk, A.G., Vazquez-Duhalt, R. (1995) Site-Directed Mutagenesis Improves the Biocatalytic Activity of Iso-1-Cytochrome c in Polycyclic Hydrocarbon Oxidation. *Enzyme and Microbial Technology*, 17: 1014-1020.

Valli, K., Brock, B., Joshi, D.K., Gold, M.H. (1991) Degradation of 2,4-dinitrotoluene by the Lignin-degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology*. 58 : 221-228.

Vazquez-Duhalt, R. (1998) Hemoproteins as Biocatalists for the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In *Advances in Bioprocess Engineering, Volumen II*. Enrique Galindo and Octavio T. Ramirez (Eds.) Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

Vazquez-Duhalt, R. (1999) Cytochrome c as Biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis : B Enzymatic* (In press).

Vazquez-Duhalt, R., Semple, K.M., Westlake, D.W., Fedorak, P.M. (1994) Effect of Water-Miscible Organic Solvents on the Catalytic Activity of Cytochrome c. *Enzyme Microbial Technology*, 15 : 936-942.

Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D.W., Fedorak, P.M. (1993) Cytochrome c as a Biocatalyst for the Oxidation of Thiophenes and Organosulfides. *Enzyme Microbial Technology*, 15 : 494-499.

Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D.W., Fedorak, P.M. (1995) Kinetics of Chemically Modified Lignin Peroxidase and Enzymatic Oxidation of Aromatic Nitrogen-containing Compounds. *Applied Microbial Technology*, 42 : 675-681.

Vilar-Rojas, C., Grenfell, A.M., Hicks, J.J. (1996) Participation of Oxygen-Free Radicals in the Oxido-Reduction of Proteins. *Archives of Medical Research*, 27(1) : 1-6.

Villarroel, A., and Regalado, M.P. (1997). A Fast and Simple Method to Introduce Multiple Distant Point Mutations. *Technical Tips on Line*. Elsevier Trend Journals. Protocol number 40068.

Vogt, W. (1995) Oxidation of Methionyl Residues in Proteins: Tools, Targets, and Reversal. *Free Radical Biology and Medicine*, 18 (1) : 93-105.

Volkin, D.B., Mach, H., Middaugh, R. (1997) Degradative Covalent Reactions Important to Protein Stability. *Molecular Biotechnology*, 8 : 105-122.

Wariishi, H., Gold, M.H. (1990) Lignin Peroxidase Compound III. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(4) : 2070-2077.

Wariishi, H., Sheng, D., Gold, M. (1994) Oxidation of Ferrocycytochrome c by Lignin Peroxidase. *Biochemistry*, 33 : 5545-5552.

Welinder (1992) Superfamily of Plant, Fungal, and Bacterial Peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* 2 : 288-292.

Wilks, A., Montellano, P.R. (1992) Intramolecular Translocation of the Protein Radical Formed in the Reaction of Recombinant Sperm Whale Myoglobin with H_2O_2 . *The Journal of Biological Chemistry*, 13 : 8827-8833.

Wong, L.L. (1998) Cytochrome P450 Monooxygenases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2: 263-268.