



Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Biotecnología

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

El papel del Ca^{2+} estructural durante la inactivación oxidativa
de la peroxidasa versátil de *Bjerkandera adusta*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

Jorge Alberto Verdín Ramos

Cuernavaca, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Rafael Vázquez Duhalt. El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del donativo Semarnat-2002-C01-1307. J.V. fue beneficiario de las becas CONACYT (144892) y UNAM (DGEP).

Agradecimientos

Este trabajo debe mucho a Rafael Vázquez, Michael Pickard, Rebecca Pogni, Alejandro Baeza, Brenda Valderrama, Adela Rodríguez, Raunel Tinoco, Rosa Román y Pilar Fernández. También lo enriquecieron las críticas de Alberto Darszon, Mario Soberón, Guillermo Gosset, Rosario Muñoz, Amelia Farrés, Baltazar Becerril y Laura Palomares.

Índice

Abreviaturas	viii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Características generales de las peroxidasas	2
2.2 Estructura de las hemoperoxidasas	2
2.3 El mecanismo catalítico	4
2.4 Desactivación oxidativa	6
2.4.1 <i>El compuesto III</i>	6
2.4.2 <i>Modelo 1. Degradación del hemo precedida de daños a la apoproteína</i>	7
2.4.3 <i>Modelo 2. La desactivación es independiente de la degradación del hemo</i>	7
2.4.4 <i>Modelo 3. Desactivación oxidativa centrada en el compuesto III</i>	8
2.4.5 <i>Modelo 4. La desactivación oxidativa parte del compuesto I</i>	8
2.5 Desactivación y Ca^{2+} estructural	8
2.5.1 <i>Dependencia de la actividad de los Ca^{2+} estructurales</i>	8
2.5.2 <i>Modelo 1. Hexacoordinación del Fe^{3+} hemínico</i>	9
2.5.3 <i>Modelo 2. Retención del ciclo catalítico en el compuesto II</i>	9
2.6 La peroxidasa versátil	10
2.6.1 <i>Características generales</i>	10
2.6.2 <i>PV, un híbrido estructural</i>	10
2.6.3 <i>Adecuación del mecanismo catalítico a la naturaleza bifuncional de la PV</i>	11
2.6.4 <i>Pertinencia de la PV como modelo para el estudio de la desactivación</i>	12
3. Hipótesis	13
4. Objetivos	14
4.1 Objetivo general	14
4.2 Objetivos particulares	14
5. Relación funcional entre el Ca^{2+} y la actividad catalítica	15
5.1 Resultados y discusión	15
5.1.1 <i>Inferencias estructurales sobre la peroxidasa versátil de <u>B. adusta</u></i>	15
5.1.2 <i>Relación actividad - Ca^{2+} estructural</i>	18

5.1.3 El estado de <i>spin</i> de la PV nativa y descalcificada	19
5.1.4 Reacción de la PV descalcificada con H ₂ O ₂	23
5.1.5 Cambios estructurales en la cavidad proximal del hemo	24
5.1.6 Reducción de la capacidad oxidante de la PV	27
5.1.7 La PV descalcificada es incapaz de formar el radical triptofanilo	27
5.2 Conclusiones	28
6. El papel del Ca ²⁺ y el W172 en la desactivación oxidativa de la PV	30
6.1 Resultados y discusión	30
6.1.1 Decaimiento de la actividad durante la desactivación oxidativa	30
6.1.2 Pérdida de triptófano y Ca ²⁺ durante la desactivación oxidativa	32
6.1.3 Contexto temporal de la liberación de Ca ²⁺	33
6.1.4 Esbozo del mecanismo de desactivación oxidativa	35
6.2 Conclusiones	35
7. Metodología	37
7.1 Materiales y reactivos	37
7.2 Modelo molecular	37
7.3 Purificación de la PV	37
7.4 Ensayos enzimáticos	37
7.5 Reacciones de desactivación	37
7.6 Espectroscopía de absorción electrónica	38
7.7 Resonancia paramagnética de electrones	38
7.8 Dicroísmo circular	38
7.9 Espectroscopía de fluorescencia	38
7.10 Potencial redox	39
7.11 Cuantificación de Ca ²⁺	39
7.12 Cuantificación del hemo	39
7.13 Cuantificación de triptófanos	39
8. Referencias	40
9. Anexo	45

Abreviaturas

BSA : albúmina sérica bovina
EDTA : etilendinitrilotetracetato disódico
EPR : resonancia paramagnética de electrones
HRP : peroxidasa de rábano
LiP : ligninasa o lignino peroxidasa
MnP : manganeso peroxidasa
PV : peroxidasa versátil

Resumen

La peroxidasa versátil (PV) de *Bjerkandera adusta* es una enzima bifuncional (con actividad Mn^{2+} -dependiente y Mn^{2+} -independiente) que se desactiva cuando pierde los Ca^{2+} estructurales o se la expone al H_2O_2 en ausencia de un sustrato reductor. Las causas de la desactivación por descalcificación, así como los eventos constituyentes del proceso de desactivación oxidativa, fueron estudiados en este trabajo. Preparaciones de la PV nativa y descalcificada se caracterizaron espectroscópicamente. Los espectros de EPR y absorción electrónica indicaron que la descalcificación induce cambios conformacionales en la cavidad del hemo. Sin embargo, los cambios no fueron suficientes para modificar el estado electrónico del Fe^{3+} hemínico, pentacoordinado y en configuración de *spin* alto, como se había sugerido en un modelo de desactivación anterior [G.R.J. Sutherland, L. Schick Zapanta, M. Tien, S.D. Aust, Role of calcium in maintaining the heme environment of manganese peroxidase, *Biochemistry* 36 (1997) 3654-3662]. No obstante, el apagamiento de la fluorescencia con acrilamida sugirió cambios conformacionales alrededor de la histidina proximal, residuo cuya posición relativa con respecto al hemo determina las propiedades redox de la enzima [T. Choinowski, W. Blodig, K.H. Winterhalter, K. Piontek, The crystal structure of lignin peroxidase at 1.7 Å resolution reveals a hydroxy group on the C-Beta of tryptophan 171: a novel radical site formed during the redox cycle, *Journal of Molecular Biology* 286 (1999) 809-827]. Sustentando lo anterior, se advirtió una reducción significativa de la capacidad oxidante de la peroxidasa: el potencial de reducción pasó de 390 mV en la forma nativa, a sólo 190 mV en la forma descalcificada. Además, la reacción de la PV descalcificada con H_2O_2 produjo una señal de EPR correspondiente al radical catiónico π del compuesto I, en sustitución del radical triptofanilo que se ha detectado en la forma nativa y que es necesario para la actividad Mn^{2+} -independiente [R. Pogni, M.C. Baratto, S. Giansanti, C. Teutloff, J. Verdin, B. Valderrama, F. Lenzian, W. Lubitz, R. Vazquez-Duhalt, R. Basosi, Tryptophan-based radical in the catalytic mechanism of versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*, *Biochemistry* 44 (2005) 4267-4274]. Estas observaciones sugieren que la pérdida de actividad, sea ésta dependiente o no de la formación del radical triptofanilo, está ligada a la disminución del poder oxidante de la enzima, propiciada, a su vez, por cambios estructurales en la cavidad proximal del hemo.

Durante la desactivación oxidativa, la actividad Mn^{2+} -dependiente decayó de forma casi paralela a la cinética de degradación del hemo, indicando una relación causa-consecuencia entre ambos fenómenos. En contraste, el decaimiento de la actividad Mn^{2+} -independiente fue significativamente más rápido que la degradación del hemo y, obviamente, que el decaimiento de la actividad Mn^{2+} -dependiente. El aceleramiento del decaimiento de la actividad Mn^{2+} -independiente con respecto a la degradación del hemo sugiere la intervención de eventos deletéreos adicionales en el proceso de desactivación, mientras que el desfase con respecto al decaimiento de la actividad Mn^{2+} -dependiente relaciona tales eventos con los elementos estructurales que propician aquella actividad. El contenido de W172, esencial para la actividad Mn^{2+} -independiente, y el de Ca^{2+} estructural, cuya pérdida impide el funcionamiento del W172 como puerto redox, fueron evaluados durante la desactivación oxidativa. Ambos elementos estructurales se perdieron significativamente (aprox. 50%) durante la desactivación. Cinéticamente, la modificación del W172 y la liberación de Ca^{2+} fueron anteriores a la degradación del hemo. Estos resultados sugieren la participación de ambos elementos estructurales en el decaimiento de la actividad Mn^{2+} -independiente.

Abstract

Versatile peroxidase (VP) from *Bjerkandera adusta* is a bifunctional enzyme (showing Mn²⁺-dependent and Mn²⁺-independent activities) that loses its catalytic activity by Ca²⁺ depletion and by exposure to H₂O₂ in the absence of reducing substrate. In this work, the mechanism of inactivation by Ca²⁺ depletion, as well as the constituting events of the process of oxidative inactivation, were studied. Spectroscopic characterization of native and Ca²⁺-depleted VP were carried out. EPR and UV-Vis spectra showed that Ca²⁺-depletion leads to conformational changes around heme cavity. However, the changes were not enough to modify the native electronic state of heme iron—pentacoordinated high spin—, as suggested in a previous inactivation model [G.R.J. Sutherland, L. Schick Zapanta, M. Tien, S.D. Aust, Role of calcium in maintaining the heme environment of manganese peroxidase, *Biochemistry* 36 (1997) 3654-3662]. Nevertheless, fluorescence quenching analysis indicated structural changes around proximal histidine, a residue whose relative position respect to heme influences the redox properties of the enzyme [T. Choinowski, W. Blodig, K.H. Winterhalter, K. Piontek, The crystal structure of lignin peroxidase at 1.7 Å resolution reveals a hydroxy group on the C-Beta of tryptophan 171: a novel radical site formed during the redox cycle, *Journal of Molecular Biology* 286 (1999) 809-827]. In support of the last, a notorious decrease of the enzyme oxidizing power was observed: redox potential decreased from 390 mV in native VP to 190 mV in the Ca²⁺-depleted form. Moreover, the reaction of Ca²⁺-depleted VP with H₂O₂ produced an EPR signal corresponding to the π-cationic radical associated with compound I, instead of the catalytically essential tryptophan-centered radical observed in native VP [R. Pogni, M.C. Baratto, S. Giansanti, C. Teutloff, J. Verdin, B. Valderrama, F. Lenzian, W. Lubitz, R. Vazquez-Duhalt, R. Basosi, Tryptophan-based radical in the catalytic mechanism of versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*, *Biochemistry* 44 (2005) 4267-4274]. These observations suggest that the loss of activity (independent or dependent on the formation of the tryptophan-centered radical) is related with structural changes in the proximal cavity of heme that decrease the enzyme oxidizing power.

During oxidative inactivation, the decay of Mn²⁺-dependent activity and heme degradation showed similar kinetics that suggests a cause-consequence relationship between them. By contrast, the decay of Mn²⁺-independent activity was faster than the kinetics of both heme degradation and Mn²⁺-dependent activity decay. The acceleration of Mn²⁺-independent activity decay with respect to heme degradation suggests the involvement of additional deleterious events during the inactivation process. On the other hand, the acceleration with respect to the decay of Mn²⁺-dependent activity relates such deleterious events with the structural elements that support Mn²⁺-independent activity. The content of W172, essential for Mn²⁺-independent activity, and structural Ca²⁺, whose loss avoids the normal behavior of W172, were monitored during oxidative inactivation. Fractions (around 50%) of both structural elements were lost during inactivation. Kinetically, the oxidative modification of W172 and Ca²⁺ release occurred before heme degradation. These results suggest that both structural elements are involved in the decay of Mn²⁺-independent activity.

1. Introducción

Las hemoperoxidasas son útiles en múltiples nichos industriales debido a su gran poder oxidante y a la amplitud de su perfil de sustratos. Sin embargo, su baja estabilidad, junto con problemas de expresión y producción en gran escala, ha impedido la expansión de su uso industrial [1-2]. Todas las hemoperoxidasas conocidas se desactivan cuando reaccionan con H_2O_2 en ausencia de un cosustrato oxidable [3]. Algunas, además, son termolábiles o pierden actividad en presencia de agentes quelantes [4-5]. Desde que fue observada, la desactivación oxidativa de las hemoperoxidasas no ha dejado de ser estudiada [3, 6-17]. Durante su curso, la peroxidasa cataliza la formación de las especies reactivas de oxígeno que a la postre la desactivan. A pesar de conocerse la naturaleza y el mecanismo de formación de estas especies [3, 12, 18], los eventos moleculares posteriores, los propiamente desactivantes, no han sido dilucidados. Generalmente, se considera al grupo hemo como el sujeto principal del daño oxidativo [3]; sin embargo, la destrucción de aminoácidos con actividad redox también ha sido reportada [19]. A partir de estas observaciones se ha propuesto que la desactivación oxidativa es el resultado de varios eventos desactivantes, siendo la destrucción del hemo tan solo uno de ellos [6, 16].

La identidad de los eventos deletéreos complementarios a la degradación del hemo no es obvia. Se puede inferir, sin embargo, que los elementos estructurales involucrados en la desactivación oxidativa deben estar funcionalmente comprometidos. Dentro de este contexto, el proceso de desactivación de la peroxidasa versátil (PV) de *Bjerkandera adusta* fue estudiado haciendo hincapié en el papel que juegan dos elementos estrechamente ligados a su actividad: los Ca^{2+} estructurales [4-5, 20] y el triptófano superficial W172 [21, 22]. En la primera parte de este trabajo se analiza la dependencia de la actividad catalítica de los Ca^{2+} estructurales y, tras examinar los cambios conformacionales producidos en la peroxidasa descalcificada, se propone un nuevo modelo para explicar dicha dependencia. En la segunda parte se estudia la desactivación oxidativa rastreando el decaimiento de las actividades Mn^{2+} -dependiente y Mn^{2+} -independiente de la PV, cada una con requisitos estructurales diferentes, e integrando al análisis el comportamiento de los Ca^{2+} estructurales y del triptófano 172 durante el proceso de desactivación.

2. Antecedentes

2.1 *Características generales de las peroxidasas*

Las peroxidasas catalizan la oxidación de una gran diversidad de sustratos orgánicos e inorgánicos acoplada a la reducción de H_2O_2 o hidroperóxidos orgánicos. Estas enzimas, clasificadas genéricamente como E.C. 1.11 [23], están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Su papel fisiológico es muy diverso: se encargan de la detoxificación del H_2O_2 , catalizan la síntesis de hormonas, antimicrobianos, antiinflamatorios y anticancerígenos; participan en la cadena respiratoria y forman parte de la maquinaria enzimática destinada a la síntesis y degradación de la lignina [1, 24].

Según la naturaleza de su sitio activo, existen tres tipos de peroxidasas: peroxidasas no metálicas, vanadioperoxidasas y hemoperoxidasas. Tanto las peroxidasas no metálicas como las vanadioperoxidasas son naturalmente halogenasas [25]. Las primeras prescinden de grupo prostético, aunque su actividad requiere la presencia de iones acetato o propionato [1, 25]. Las vanadioperoxidasas contienen un ión vanadato que, previamente oxidado por el H_2O_2 , oxida iones halogenuro que permanecen unidos a la enzima hasta que llega un segundo sustrato para ser oxidativamente halogenado [1, 24-25]. El grupo más numeroso y mejor estudiado es el de las hemoperoxidasas. Estas enzimas contienen una protoporfirina IX (hemo) como grupo prostético, a quien deben el poder oxidante y la versatilidad catalítica de la que carecen las otras. Colectivamente, las hemoperoxidasas catalizan reacciones de deshidrogenación y halogenación oxidativa, dismutación de H_2O_2 y reacciones de transferencia de oxígeno [26].

Esa versatilidad ha dotado a las hemoperoxidasas de un enorme potencial biotecnológico. Las que forman parte de la maquinaria de delignificación de los hongos de pudrición blanca han sido empleadas en la degradación de contaminantes recalcitrantes [2, 27-30]. También han sido utilizadas como una alternativa biocatalítica en la obtención de pulpa para la producción de papel y en la desulfuración del petróleo [31-33]. Algunas otras son utilizadas como biosensores, en inmunoensayos o en la producción de sintones quirales, precursores, a su vez, de una gran diversidad de fármacos y productos naturales [1, 26, 34].

2.2 *Estructura de las hemoperoxidasas*

Las hemoperoxidasas están estructuralmente organizadas en dos dominios, proximal y distal, en cuya interfase se aloja el grupo hemo (Figura 2.1). Éste se comunica con la superficie a través de un canal por donde entran los sustratos para interaccionar directamente con él. En la lignino peroxidasa (LiP) de *Phanerochaete chrysosporium*, la transferencia de electrones del sustrato al hemo se realiza de manera indirecta. Para tal efecto, la enzima se vale de un residuo superficial, W171 (Figura 2.1) [35-37].

2. Antecedentes

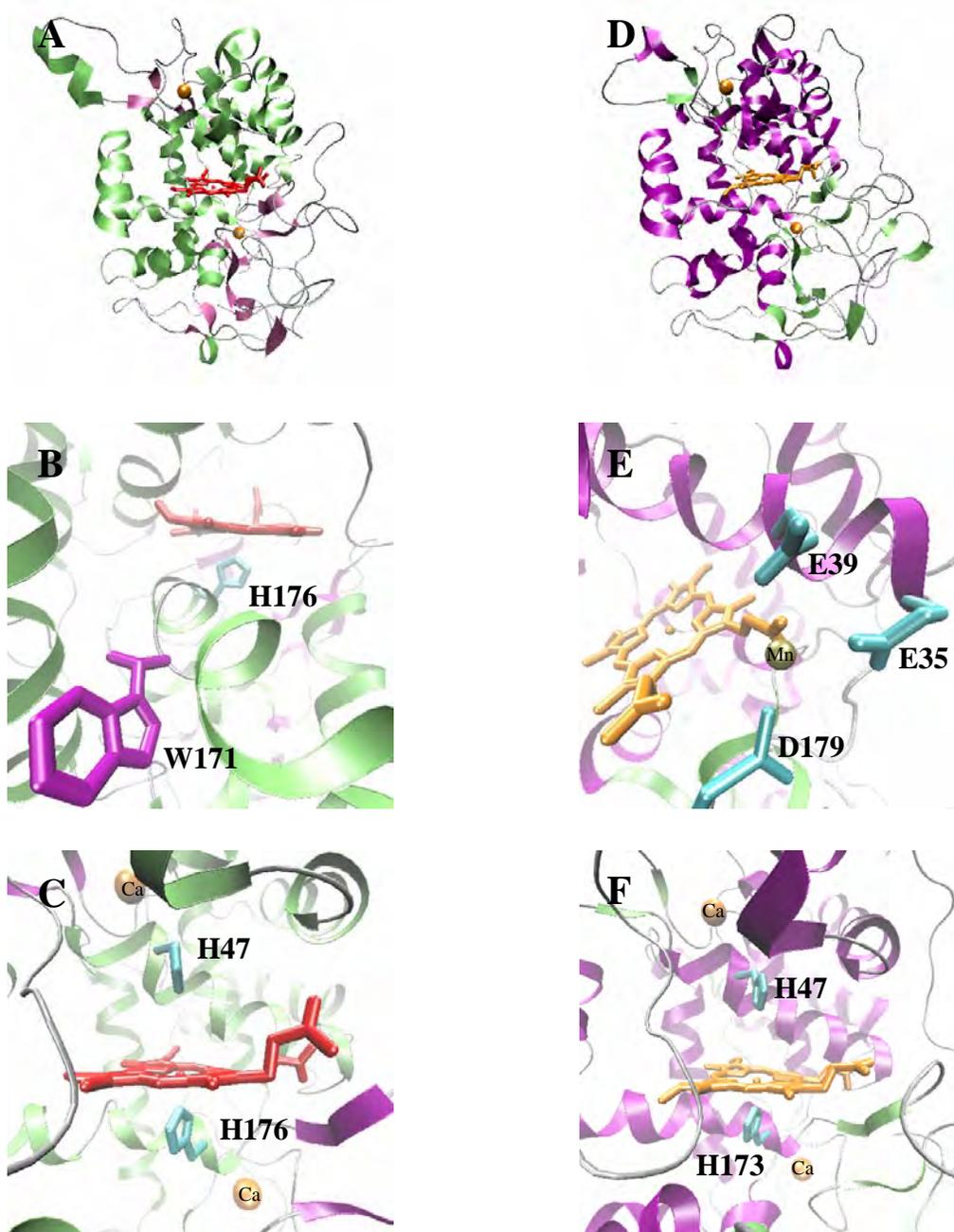


Figura 2.1. (A) Plegamiento, (B) vía de transferencia de electrones y (C) cavidad del hemo de la lignino peroxidasa (PDB: 1B80) de *Phanerochaete chrysosporium*. (D) Plegamiento, (E) sitio de unión a Mn^{2+} y (F) cavidad del hemo de la manganeso peroxidasa (PDB: 1MNP) de *Phanerochaete chrysosporium*. Las imágenes fueron generadas con VMD [109].

2. Antecedentes

Además de las cuatro ligaduras ecuatoriales que lo unen a la porfirina, el Fe^{3+} hemínico está coordinado axialmente por residuos de la proteína. De hecho, su reactividad está asociada con la naturaleza y circunstancia fisicoquímica de los ligandos axiales [38]. Dependiendo de la peroxidasa, éstos pueden ser residuos de histidina, cisteína o ácido glutámico [39]. En la LiP y en la manganeso peroxidasa (MnP) de *Phanerochaete chrysosporium* ambos ligandos son histidinas (Figura 2.1). La histidina proximal, quinto ligando del Fe^{3+} , determina el potencial de reducción de la enzima al regular la estabilidad de los intermediarios catalíticos [40]. Del otro lado del hemo, la histidina distal, junto con residuos de asparagina y arginina, se encarga de la heterólisis ácido-base del H_2O_2 , paso necesario para el inicio del ciclo catalítico. La ligadura distal puede o no hexacoordinar el Fe^{3+} . En las peroxidases de la clase II, como LiP y MnP, la histidina distal no lo hexacoordina [35-36, 38].

También son característicos de esta clase de peroxidases (LiP y MnP) dos iones Ca^{2+} , cada uno localizado junto a una de las histidinas axiales (Figura 2.1). Ambos Ca^{2+} juegan un papel importante en la configuración y estabilidad de la cavidad del hemo [41]. De hecho, algunos de los residuos que los ligan pertenecen a las hélices que forman dicha cavidad. Se ha propuesto, incluso, que la distancia del enlace histidina-proximal: Fe^{3+} -hemínico, uno más de los factores que influyen en el potencial redox de la enzima, es regulada por el Ca^{2+} proximal [38]. Homológamente, el Ca^{2+} distal, cuyos ligandos son vecinos de la histidina distal, mantiene fija la posición de ese residuo evitando la hexacoordinación del Fe^{3+} del hemo [42].

Las hemoperoxidasas están lejos de ser un grupo estructuralmente homogéneo. Si bien las más emblemáticas (clase II y III de la superfamilia de las peroxidases de plantas: LiP, MnP y HRP) se ajustan a lo descrito arriba, hay otras cuyas diferencias con éstas no son sutiles. Por ejemplo, las peroxidases de mamífero, como la mieloperoxidasa, son dimericas (Figura 2.2). Cada dímero está compuesto por dos polipéptidos, un hemo (covalentemente unido a la proteína) y solo un ion Ca^{2+} , también involucrado en la estabilización de la molécula [43-44]. La cloroperoxidasa por sí sola forma un grupo aparte. Esta enzima posee un plegamiento único, híbrido de hemoperoxidasa y citocromo P450 (Figura 2.2). Su grupo hemo está axialmente ligado por un residuo de cisteína en su lado proximal, mientras que por el lado distal un ácido glutámico hace el papel de base general necesario para el inicio del ciclo catalítico. La proteína contiene un ion Mn^{2+} cuya utilidad estructural no es clara, ya que su ausencia no afecta la actividad de la enzima [45]. Aun dentro de la superfamilia de las peroxidases de plantas hay diferencias. Las de la clase I, como la citocromo c peroxidasa y la ascorbato peroxidasa, carecen de enlaces bisulfuro, iones Ca^{2+} y no están glicosiladas, todo lo cual es característico de las peroxidases de la clase II y III [39, 46-47].

2.3 El mecanismo catalítico

A pesar de la diversidad de sus preferencias por sustrato, el ciclo catalítico de todas las hemoperoxidasas es similar (Figura 2.3). Durante la primera etapa, una molécula de H_2O_2 oxida a la peroxidasa generando el compuesto I. Esta reacción la catalizan los residuos *histidina y arginina distales*, ambos conservados en todos los miembros conocidos de la superfamilia de las peroxidases de plantas [48]. Inicialmente, la molécula de H_2O_2 dona el

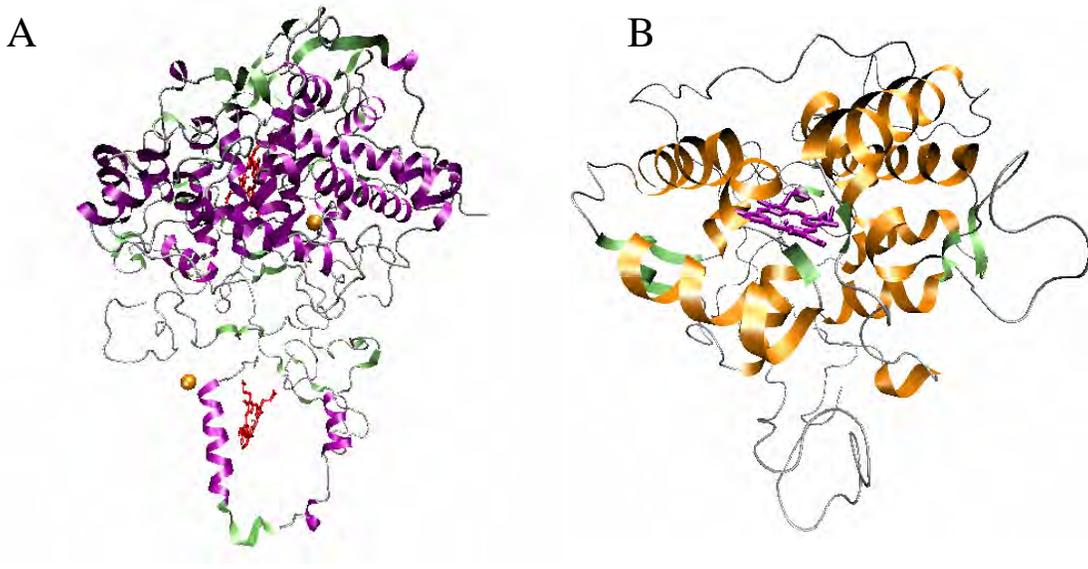


Figura 2.2. Diversidad estructural de las hemoperoxidasas. Además del plegamiento de la familia de las peroxidasas de plantas, ilustrado en la Figura 2.1, otros grupos son formados por (A) las peroxidasas de mamífero (Mieloperoxidasa humana, sólo un monómero mostrado: 1CXP) y (B) la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* (1CPO). Las imágenes fueron generadas con VMD [109].

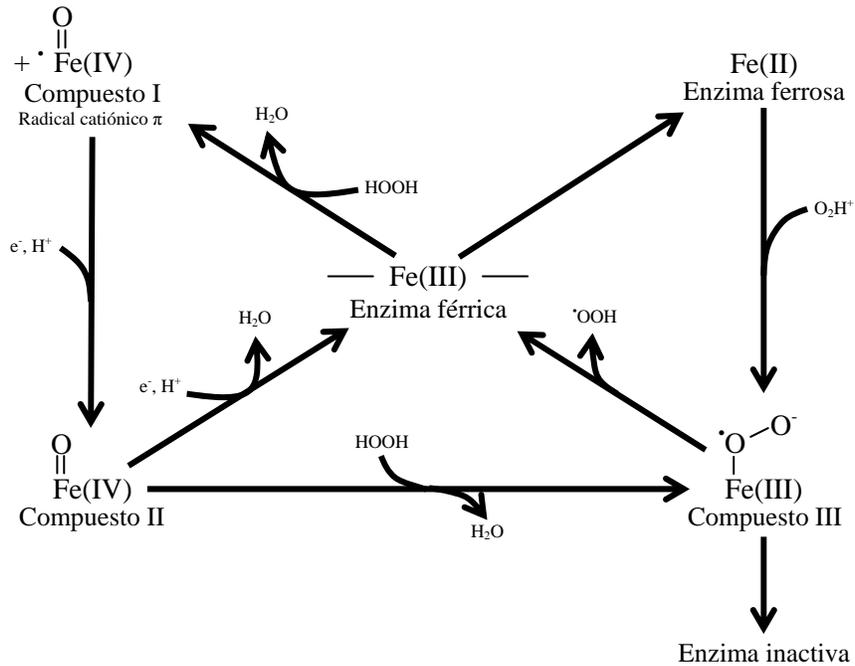


Figura 2.3. Ciclo peroxidásico (izquierda) y formación del compuesto III (derecha).

2. Antecedentes

protón de su oxígeno α (el unido al átomo de Fe^{3+}) a la histidina distal (Figura 2.4). Más tarde, el oxígeno α desprotonado oxida el Fe^{3+} hemínico y, simultáneamente, el protón de la histidina distal se transfiere al oxígeno β ocasionando la heterólisis de la molécula [48-49]. En el compuesto I el Fe hemínico se encuentra bajo la forma de un centro oxoferrilo ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$). Además, este intermediario contiene un radical catiónico π que generalmente se aloja en el hemo, aunque en la citocromo c peroxidasa se le ha detectado en un triptófano adyacente [50]. A partir de este punto, dos reducciones sucesivas devuelven al estado basal de la enzima. En la primera, un electrón del sustrato reductor estabiliza el radical catiónico π del compuesto I dando lugar al compuesto II. Luego, el mismo sustrato oxidado, u otro aún sin oxidar, proporciona un electrón adicional que reduce el centro oxoferrilo ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) a la forma férrica del estado basal [51].

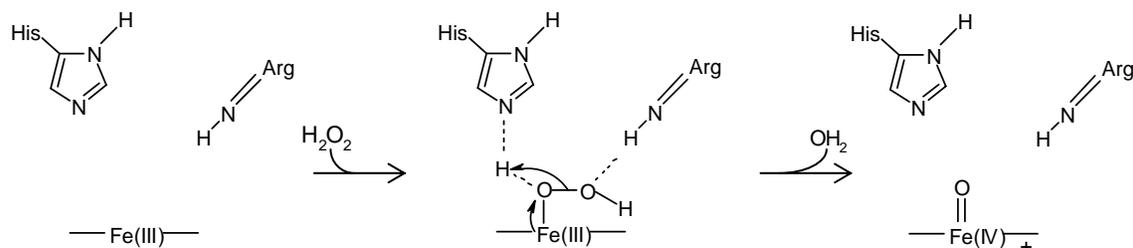
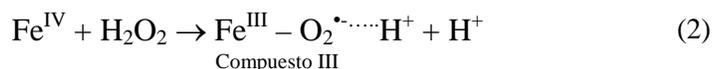
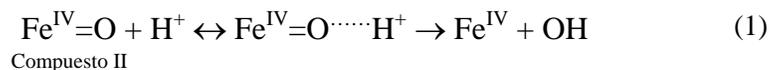


Figura 2.4. Heterólisis ácido-base del H_2O_2 para la formación del compuesto I.

2.4 Desactivación oxidativa

2.4.1 El compuesto III

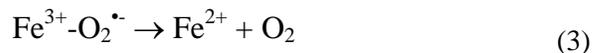
La desactivación oxidativa de las hemoperoxidasas está ligada al compuesto III [7, 52]. Esta especie, situada fuera del ciclo peroxidásico, se puede formar: (a) partiendo de la peroxidasa férrica y el anión superóxido, (b) desde la enzima ferrosa en presencia de oxígeno molecular, o (c) a partir del compuesto II en presencia de un exceso de H_2O_2 por una reacción de intercambio de ligandos (Figura 2.3, Ecs. 1-2) [3, 18, 52].



Aunque la estructura electrónica del compuesto III es frecuentemente descrita como $\text{Fe}^{3+} - \text{O}_2^{\cdot-}$, también se ha propuesto la estructura $\text{Fe}^{2+} - \text{O}_2$ con la densidad electrónica fuertemente desplazada hacia el oxígeno [18, 53]. Esta especie decae espontáneamente produciendo

2. Antecedentes

oxígeno molecular e iones ferrosos (Ec. 3), los cuales, en presencia de H₂O₂ adicional, generan radicales hidroxilo mediante la reacción de Fenton (Ec. 4) [12, 54]:



El radical hidroxilo (HO·) es el responsable directo de la degradación del hemo, el fenómeno más evidente asociado a la desactivación oxidativa [3, 7, 18]. Este radical, debido a su reactividad, no se desplaza demasiado del sitio donde se genera antes de reaccionar [55-56]. Es por ello que su principal blanco—si no es que el único—es el anillo tetrapirrólico del hemo [9].

2.4.2 Modelo 1. Degradación del hemo precedida de daños a la apoproteína

A pesar de ser protagonista del proceso de desactivación, la degradación del hemo no es el único daño que sufren las hemoproteínas sometidas a estrés oxidativo [57]. En algunas se ha observado la formación de dímeros intermoleculares de tirosina y la hidroxilación de triptófanos [19, 58]. Ya en 1966, luego de observar que la velocidad de degradación del hemo era menor que la de pérdida de actividad, Weinryb sugirió que la desactivación oxidativa de la HRP no sólo involucraba la destrucción del hemo sino también el daño específico a algún otro sitio de la proteína [6]. En este modelo, la desactivación en el *sitio no hemínico* ocurre antes que la destrucción del hemo y necesariamente involucra residuos comprometidos con la actividad.

2.4.3 Modelo 2. La desactivación es independiente de la degradación del hemo

Partiendo de una triple mutante del citocromo c de levadura capaz de eludir la destrucción del hemo, aunque no la desactivación, Villegas *et al.* infirieron que la destrucción del hemo era un proceso independiente de la pérdida de actividad [59]. La desactivación, sugieren, es el resultado de las modificaciones químicas que sufren los residuos de la cadena polipeptídica y no de la degradación del hemo, que sucede cuando la proteína ya no es activa. Aunque el citocromo oxidativamente inactivado pierde residuos de cisteína, metionina, tirosina y lisina [59], la naturaleza y ubicación precisa del daño desactivante aún no han sido esclarecidas. En un trabajo reciente se analizó la pérdida de la hexacoordinación axial del hemo con la Met80, atribuida a la oxidación de dicho residuo, y la formación de dímeros de tirosina durante la desactivación oxidativa del citocromo c de corazón de caballo [17]. Aunque esas modificaciones son producto de las especies generadas durante el proceso de desactivación, ninguna de ellas resultó desactivante [17, 59].

2.4.4 Modelo 3. Desactivación oxidativa centrada en el compuesto III

En otro modelo de desactivación, los daños al hemo y a la apoproteína son atribuidos por completo al compuesto III [16]. Esta especie podría dañar a la hemoperoxidasa en tres formas distintas: 1) oxidando *in situ* el anillo tetrapirrólico del hemo, 2) oxidando los aminoácidos más próximos de la cavidad del hemo y 3) decayendo unimolecularmente para producir radicales hidroxilo—más reactivos que los peroxilo—que debido a su solubilidad son capaces de oxidar residuos remotos. Una vez formado el radical en la apoproteína, éste se desplazaría hacia el residuo con el menor potencial de reducción dando origen a las modificaciones químicas observadas [16].

2.4.5 Modelo 4. La desactivación oxidativa parte del compuesto I

La desactivación de las hemoperoxidasas mediada por el compuesto III, incluidos los intermediarios en su ruta de formación, no es un modelo unánimemente aceptado. La generación del verdehemocromo o P670, compuesto inactivo detectado en algunas hemoperoxidasas después de la formación del compuesto I [60], así como la actividad catalasa observada cuando el único sustrato de la enzima es el H_2O_2 , son las premisas fundamentales de un modelo cinético que considera al compuesto I como el pivote desde donde parten tres rutas catalíticas independientes: a) vía catalítica, b) vía del compuesto III, y c) vía de la desactivación (Figura 2.5) [10]. Según este modelo, el compuesto I puede ser reducido por el H_2O_2 mediante la transferencia de dos electrones, regenerando la enzima férrica y oxígeno molecular (actividad catalasa), o transfiriéndole tan sólo un electrón para formar el compuesto II y radicales superóxido. La segunda opción es considerada una vía menor en comparación con la fuerza de la vía de la catalasa, debido a lo cual la formación del compuesto III y sus efectos deletéreos son despreciados [10, 61]. La función de la vía catalítica, así como la del compuesto III, es proteger a la enzima del H_2O_2 evitando, en el primer caso, el aumento de la concentración del compuesto I y, en el segundo, el recambio catalítico a través de él [10-11, 62-64]. El efecto protector de la primera es evidente cuando el H_2O_2 es sustituido por el ácido m-cloroperoxibenzóico. Este pseudo-sustrato inactiva a la HRP con una eficiencia 100 veces mayor que la observada con el H_2O_2 ya que es incapaz de dismutarse catalíticamente [11]. La principal evidencia de que la desactivación parte del compuesto I es la formación de la especie enzimática P670 precedida de la especie P965, esta última identificada como un complejo formado por el compuesto I y una molécula de H_2O_2 [10-11]. Además, la formación del P670 es independiente del compuesto III y, aun en su presencia, la desactivación procede a partir del complejo [compuesto I: H_2O_2] debido a la descomunal proporción del recambio catalítico producido a través de la vía de la catalasa y a la baja velocidad de decaimiento del compuesto III hacia la enzima férrica [14, 64].

2.5 Desactivación y Ca^{2+} estructural

2.5.1 Dependencia de la actividad de los Ca^{2+} estructurales

Además de la sensibilidad al H_2O_2 , las hemoperoxidasas de las clases II y III se inactivan reversiblemente cuando pierden sus Ca^{2+} estructurales. Esto generalmente se consigue

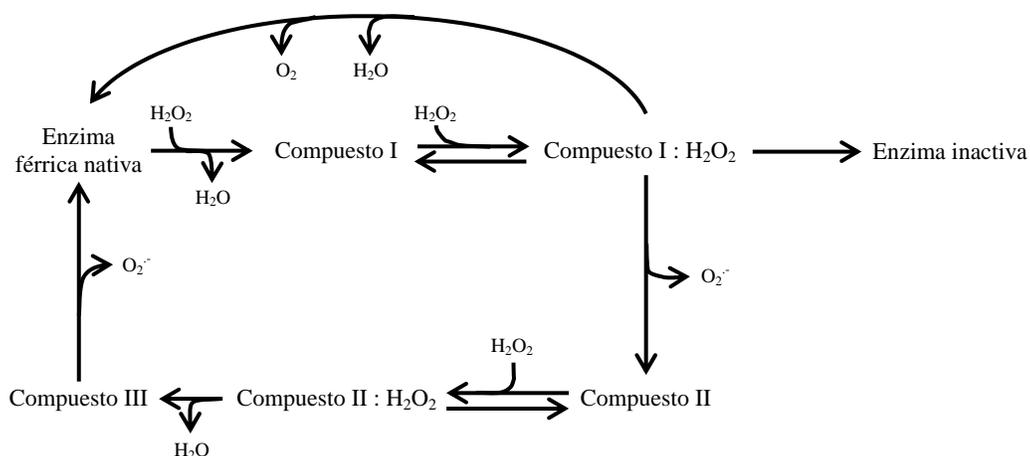


Figura 2.5. Mecanismo de reacción de las peroxididasas con H_2O_2 en ausencia de otros sustratos.

cuando se las expone a medianas temperaturas, a EDTA o a pH alcalino [4, 20, 65]. El grado de dependencia de la actividad de los Ca^{2+} estructurales es variable de una hemoperoxidasa a otra. Mientras que la HRP sólo pierde una fracción de su actividad (60%) cuando se la descalcifica [20], la MnP y la LiP de *Phanerochaete chrysosporium* se inactivan totalmente [4-5]. Estos iones, como ya se apuntó, son responsables de la estabilidad de la cavidad del hemo, sitio donde se encuentran los residuos que determinan el poder oxidante de la enzima o que forman el sitio de unión a peróxido [38, 41-42, 66].

2.5.2 Modelo 1. Hexacoordinación del Fe^{3+} hemínico

Tanto en la MnP como en la LiP de *Phanerochaete chrysosporium*, la desactivación por pérdida de Ca^{2+} ha sido asociada con la hexacoordinación del Fe^{3+} hemínico [5, 65, 67-68]. Al perderse el Ca^{2+} por efecto térmico, o secuestrado por un agente quelante, la hélice que forma parte del sitio de unión, y que también contiene la histidina distal, adquiere mayor flexibilidad. De este modo, la histidina distal consigue coordinar el Fe^{3+} del hemo quedando impedida para catalizar la heterólisis del H_2O_2 , paso necesario para el inicio del ciclo catalítico (Figura 2.6). El principal inconveniente de este modelo es que fue generado con información obtenida bajo condiciones en las que las peroxididasas fúngicas son inactivas independientemente de su contenido de Ca^{2+} (pH 7 o mayor).

2.5.3 Modelo 2. Retención del ciclo catalítico en el compuesto II

En la peroxidasa de rábano (HRP), los cambios estructurales producidos tras la pérdida del Ca^{2+} no impiden el inicio del ciclo catalítico ya que ha sido observada la formación del compuesto I [69]. Sin embargo, esos cambios sí afectan la reducción del compuesto II impidiendo el retorno de la enzima a la forma nativa. Como este paso determina la velocidad general de la reacción, se infiere que el decremento de su velocidad se traduce en menor actividad [70]. Las razones estructurales del aumento de la estabilidad del compuesto II no son claras. No obstante, la HRP descalcificada exhibe una gran heterogeneidad conformacional en las cavidades axiales al hemo [70, 71]. Esas modificaciones están

acompañadas de la disminución de la deformación de la protoporfirina (en forma de silla de montar), característica a la que se atribuye la gran reactividad de las hemoperoxidasas [72-74].

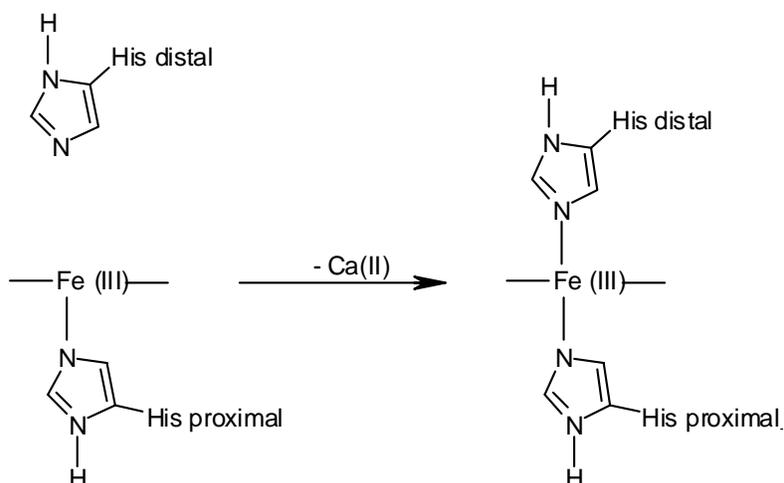


Figura 2.6. Desactivación de las hemoperoxidasas por pérdida de Ca^{2+} . Modelo de la hexacoordinación del Fe hemínico.

2.6 La peroxidasa versátil

2.6.1 Características generales

La peroxidasa versátil (PV) es, junto con la LiP y la MnP, parte de la maquinaria enzimática que los hongos de podredumbre blanca utilizan para degradar la lignina. Frecuentemente, la PV es descrita como un híbrido funcional de la MnP y la LiP. Sin embargo, en función de la actividad que desempeña con mayor eficiencia, es más exacto definirla como una manganeso peroxidasa que, además, es capaz de oxidar algunas moléculas prescindiendo de la mediación redox del Mn^{2+} [75-77]. Durante la actividad dependiente de Mn^{2+} , la enzima oxida el ion Mn^{2+} a Mn^{3+} y se vale de su mediación para oxidar aminas aromáticas o compuestos fenólicos como el 2,6-dimetoxifenol o el guaicol [77]. Empero, lo que hace valiosa a la PV es su capacidad para oxidar directamente compuestos no fenólicos como el alcohol veratrílico, sustrato que define a la LiP y que la MnP clásica es incapaz de oxidar [75, 77]. Esta enzima fue inicialmente aislada de cultivos de *Pleurotus sp.* [75] y, posteriormente, también se obtuvo de cultivos de *Bjerkandera sp.* [76-77].

2.6.2 PV, un híbrido estructural

Las coordenadas de la estructura cristalográfica de la PV de *Pleurotus eryngii* fueron publicadas recientemente [78] (PDB 2BOQ). La molécula conserva el par de dominios α característicos de todas las hemoperoxidasas, así como los puentes bisulfuro y el par de

sitios de unión a Ca^{2+} típicos de las de las clases II y III [39]. La naturaleza bifuncional de la enzima se justifica en la estructura. Ésta contiene dos sitios de unión a sustrato, uno adecuado para la actividad Mn^{2+} -dependiente—propriadamente, el sitio de unión a Mn^{2+} —y otro para la actividad Mn^{2+} -independiente o ligninasa. Al igual que en la MnP, el sitio de unión a Mn^{2+} está formado por uno de los propionatos del hemo y los residuos Glu36, Glu40 y Asp175. Los sustratos que son oxidados sin la mediación del Mn^{2+} interactúan directamente con el hemo o con el Trp164. Este residuo tiene su homólogo funcional y estructural en la LiP [66, 79]. Durante la reacción catalítica, los compuestos I y II oxidan el Trp164 generando un radical que, para satisfacerse, oxida al alcohol veratrílico, uno de sus sustratos [21, 78].

2.6.3 Adecuación del mecanismo catalítico a la naturaleza bifuncional de la PV

Salvo en la citocromo c peroxidasa, el radical catiónico π del compuesto I se aloja en el anillo del hemo [48]. A la luz de las necesidades funcionales de la LiP y la PV, el radical triptofanilo, producto y sustituto del radical que inicialmente se aloja en el hemo, es una forma alternativa del compuesto I. En la PV, ambas formas se encuentran en equilibrio y la abundancia relativa de cada una depende de la naturaleza del sustrato disponible. La forma hemocéntrica (compuesto I_A) alimenta la actividad Mn^{2+} -dependiente, mientras que la forma triptofánica (compuesto I_B) hace lo propio con la Mn^{2+} -independiente (Figura 2.7) [78]. Análogamente, el compuesto II decae siguiendo una de dos rutas posibles: a) *ruta clásica*, en la que el oxoferrilo [$\text{Fe}^{4+}=\text{O}$] es directamente reducido por el sustrato hacia la forma nativa (actividad Mn^{2+} -independiente); y b) *ruta triptofánica*, en la que el oxoferrilo [$\text{Fe}^{4+}=\text{O}$] se reduce a Fe^{3+} a costa de la formación de un radical en el Trp164 que, a su vez, se vale de la oxidación del sustrato para regenerar la enzima nativa (actividad Mn^{2+} -independiente) (Figura 2.7).

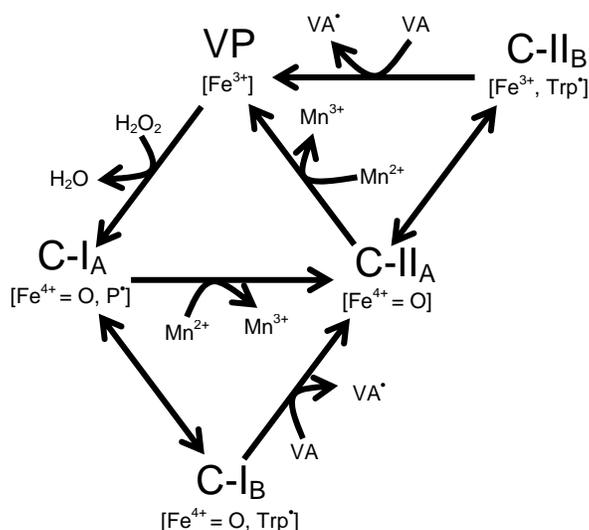


Figura 2.7. Adaptación del ciclo peroxidásico de las hemoperoxidasas a la naturaleza bifuncional de la peroxidasa versátil.

2.6.4 Pertinencia de la PV como modelo para el estudio de la desactivación

La PV es un modelo interesante para el estudio de la desactivación de las hemoperoxidasas. La coexistencia de dos actividades catalíticas en la misma enzima, cada una sustentada mecánica y estructuralmente por elementos diferentes, abre ventanas de observación distintas para el examen del proceso de desactivación. Mientras que la actividad Mn^{2+} -independiente descansa en un residuo muy oxidable, W172, la actividad Mn^{2+} -dependiente se finca en un sitio de unión a Mn^{2+} integrado por residuos oxidativamente menos vulnerables, aunque ligado a la integridad del hemo a través del grupo propionato que también forma parte de él. Igualmente, la dependencia de la actividad catalítica de los Ca^{2+} estructurales puede ser revisada y analizada en el contexto de la desactivación oxidativa teniendo las ventajas que dan dos puestos de observación. Así, el carácter híbrido de la PV ofrece posibilidades de análisis que son inaccesibles a la MnP y la LiP.

3. Hipótesis

Durante la desactivación oxidativa de la PV de *Bjerkandera adusta* UAMH 8258, además del grupo hemo, el triptófano superficial 172 y los residuos que forman los sitios proximal y distal de unión a Ca^{2+} podrían ser blanco de las especies deletéreas producidas durante el proceso de desactivación. La perturbación, modificación o destrucción de esos elementos estructurales, debido a su compromiso funcional, podrían ser parte de las causas moleculares que conducen a la desactivación de la enzima.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Estudiar el proceso de desactivación oxidativa de la PV de *Bjerkandera adusta* examinando el papel que juegan en tal proceso los componentes estructurales de la enzima comprometidos con la actividad.

4.2 Objetivos particulares

- 1) Determinar la naturaleza de la dependencia de la actividad de los Ca^{2+} estructurales.
- 2) Analizar el papel que juegan los Ca^{2+} estructurales, junto con el triptófano 172, en el proceso de desactivación oxidativa.

5. Relación funcional entre el Ca^{2+} y la actividad catalítica

5.1 Resultados y discusión

5.1.1 Inferencias estructurales sobre la peroxidasa versátil de *B. adusta*

Recientemente, la secuencia nucleotídica de la PV de *Bjerkandera adusta* UAMH 8258 (GenBank DQ060037) se unió a las previamente reportadas para las peroxidases versátiles de *Bjerkandera sp.* B33/3 (GenBank AY217015) [80], *Pleurotus sapidus* (GenBank AM039632), *Lepista irina* (GenBank AJ515245) [81], y *Pleurotus eryngii* PS1 (GenBank AF175710) [82], VPL1 (GenBank AF007223) [83] y VPL2 (GenBank AF007224) [83]. La secuencia de la PV de *B. adusta* UAMH 8258 es muy semejante a la de la PV de *Bjerkandera sp.* B33/3 (98% de identidad), difiriendo tan solo en los residuos I57, S93, T167 y T323 (Figura 5.1). Con las PVs de *Pleurotus sapidus*, *Lepista irina*, y VPL1 y VPL2 de *Pleurotus eryngii*, la identidad es del 70%, mientras que con la peroxidasa PS1 del mismo *Pleurotus eryngii* la identidad se reduce al 68%. Con la LiP (GenBank M27401) y la MnP (GenBank M60672) de *Phanerochaete chrysosporium*, homólogas funcionales parciales de la PV, la identidad es del 64% y 55%, respectivamente. Algunas firmas, como la de los residuos que forman los sitios de unión a Ca^{2+} , se conservan en todas las secuencias. La firma del sitio distal está formada por los residuos G64, G65, G66, G67, A68, D69, G70 y S71 (numeración de la PV de *B. adusta* UAMH 8258); y la del sitio proximal por los residuos P193, F194, D195, S196, T197, P198, F201 y D202. Las PVs de *Bjerkandera adusta* UAMH 8258, *Bjerkandera sp.* B33/3 y la PS1 de *Pleurotus eryngii* presentan una inserción más o menos conservada (A58, A59, T60, G61, K62 y F63, en la PV de *B. adusta* UAMH 8258) ausente en las otras versátiles, aunque presente en la LiP de *Phanerochaete chrysosporium*. Filogenéticamente, las PVs de *Pleurotus sapidus*, *Lepista irina*, y VPL1 y VPL2 de *Pleurotus eryngii* forman un grupo distinto al que forman las de *Bjerkandera adusta* UAMH 8258 y *Bjerkandera sp.* B33/3, estas últimas más próximas a la LiP y MnP de *Phanerochaete chrysosporium* (Figura 5.2).

Teniendo como criterios la identidad de secuencia, la proximidad filogenética y la disponibilidad de las estructuras cristalográficas, se construyó un modelo molecular para la secuencia de la PV de *B. adusta* UAMH 8258 utilizando como plantados las estructuras cristalográficas de la PV VPL2 de *Pleurotus eryngii* (PDB 2BOQ) y la de la LiP (PDB 1B80) y MnP (PDB 1MNP) de *Phanerochaete chrysosporium* (Figura 5.3). La PV presenta el plegamiento típico de las peroxidases de plantas, constituido por dos dominios α que alojan en su interfase al grupo prostético hemo [39, 84]. De hecho, las hélices α son los elementos de estructura secundaria más abundantes de la proteína (43%), según se estimó mediante dicroísmo circular. Esta composición es característica de las peroxidases de esta familia (Tabla 5.1) y se ha sugerido que está relacionada con el control de la transferencia de electrones a través de las mismas [85]. Al igual que la PV de *P. eryngii*, la PV de *B. adusta* contiene un sitio de unión a Mn^{2+} integrado por los residuos E37, E41 y D183; y un triptófano superficial, W172, que estructuralmente corresponde al W171 de LiP y al W164

5. Relación funcional entre el Ca^{2+} y la actividad catalítica

DQ060037	1	-----VACDGVNATNAACALFAVRDDIIONLFDGCECGEEVHESLSTFHDAIGISVSIAAATGKFGGGGADGSIIMIFDDIEPNFH
Ax217015	1	-----VACDGVNATNAACALFAVRDDIIONLFDGCECGEEVHESLSTFHDAIGISVSIAAATGKFGGGGADGSIIMIFDDIEPNFH
AM039632	1	-----ATCADGE--ETANAACVLFPLLDIIONLFDGQCGEEVHESLSTFHDAIGFSTL-----GGGADGSIIMIFDDIETVFP
AJ515245	1	-----ATCADGE--ETANAACVLFPLLDIIONLFDGQCGEEVHESLSTFHDAIGFSTL-----GGGADGSIIMIFDDIETVFP
AF175710	1	-----VICATGC--ETANAACVLFPLLDIIONLFDGQCGEEVHESLSTFHDAIGFSTL-----GGGADGSIIMIFDDIETVFP
AF007223	1	-----ATCADGE--ETANAACVLFPLLDIIONLFDGQCGEEVHESLSTFHDAIGFSTL-----GGGADGSIIMIFDDIETVFP
AF007224	1	-----ATCADGE--ETANAACVLFPLLDIIONLFDGQCGEEVHESLSTFHDAIGFSTL-----GGGADGSIIMIFDDIETVFP
M27401	1	AAVIERATCNGE--EVDGAKCAWFVLDIIONLFRGCGAHESIKLVFHSIAISVAMEAQQGGGADGSIIMIFDDIETAFH
M60672	1	-----AVCPDGT--RVSHAACAFIPLAQDLOETIQN--ECGEDAEVITFHDAIASISQ-----GKAGGADGSIIMIFDTPVNF
DQ060037	54	ANNVBEIISAKKEFFAKHN--KTAGDFFQFAGAVGVSHGCPAPOLSFFLGGPAATQAPDGGVPEPFDSDVIDENRFADGGFTTQVEVVM
Ax217015	54	ANNVBEIINQKEFFAKHN--KTAGDFFQFAGAVGVSHGCPAPOLSFFLGGPAATQAPDGGVPEPFDSDVIDENRFADGGFTTQVEVVM
AM039632	77	ANAGDEIVSAKKEFFAKHN--ISAGDFFQFAGAVGVSHGCPGGVRIFFLGGPDAAVASPDHIVPEPFDSDVIDENRFADGGFTTQVEVVM
AJ515245	77	ANAGDEIVSAKKEFFAKHN--ISAGDFFQFAGAVGVSHGCPGGVRIFFLGGPDAAVASPDHIVPEPFDSDVIDENRFADGGFTTQVEVVM
AF175710	83	ANLGDIEIVSAKKEFFAKHN--ISAADFFQFAGAVGVSHGAPRLEFFLGGPDATQPPDGVPEPFDSDVIDENRFADGGFTTQVEVVM
AF007223	77	ANLGDIEIVSAKKEFFAKHN--ISAGDFFQFAGAVGVSHGCPGGVRIFFLGGPDAAVASPDHIVPEPFDSDVIDENRFADGGFTTQVEVVM
AF007224	77	ANAGDEIVSAKKEFFAKHN--ISAGDFFQFAGAVGVSHGCPGGVRIFFLGGPDAAVASPDHIVPEPFDSDVIDENRFADGGFTTQVEVVM
M27401	50	PHIGLEIVKQNEFFVQKHG--VTPGDFR.AFAGAVALSHPGAPQMFFFIGR.APATQAPDGGVPEPFDSDVIDENRFADGGFTTQVEVVM
M60672	79	ANNGLSDSVNRLIEFKKHNTISAADLVQFAGAVALSHPGAPRLEFFLGGPAATQAPDGGVPEPFDSDVIDENRFADGGFTTQVEVVM
DQ060037	173	LLASHSIAAADHVEPTTPGSPEDSPEPTQFVETLKKGLTFPSTSCHEVESESE
Ax217015	173	LLASHSIAAADHVEPTTPGSPEDSPEPTQFVETLKKGLTFPSTSCHEVESESE
AM039632	165	LLASHSIAAADLVPSLPGTPEPSTPGVLSQFIEIQKGRLEFPQTPDKHGEVQSEI
AJ515245	165	LLASHSIAAADLVPSLPGTPEPSTPGVLSQFIEIQKGRLEFPQTPDKHGEVQSEI
AF175710	171	LLASHTIAAADHVPSPGTPEDSTPSPSOFLEIQKGRLEFPQTPDKHGEVQSEI
AF007223	165	LLASHSIAAADHVPSPGTPEDSTPSPSOFLEIQKGRLEFPQTPDKHGEVQSEI
AF007224	165	LLASHSIAAADHVPSPGTPEDSTPSPSOFLEIQKGRLEFPQTPDKHGEVQSEI
M27401	179	MESASVAAVVDVETVQGLPDSSTPGVLSQFIEIQKGRLEFPQTPDKHGEVQSEI
M60672	169	LLASHSVAAVVDVETVQGLPDSSTPGVLSQFIEIQKGRLEFPQTPDKHGEVQSEI
DQ060037	256	VNNQPMQVLKKAAMKLSILEGDLTQMIKCSDVIP--VPPSTAVAGSHLPAAGTLLDIEQAC--ASTPFFLTAADPPGATSVAPVPPS-
Ax217015	256	VNNQPMQVLKKAAMKLSILEGDLTQMIKCSDVIP--VPPSTAVAGSHLPAAGTLLDIEQAC--ASTPFFLTAADPPGATSVAPVPPS-
AM039632	248	VNNQPIONRRAATMSKMLLQDQKTKLICSDVIP--TPPALVGAHLPAGFSLSDVEQAC--AETFPALADPPGATSVAPVPPS-
AJ515245	248	VNNQPIONRRAATMSKMLLQDQKTKLICSDVIP--TPPALVGAHLPAGFSLSDVEQAC--AETFPALADPPGATSVAPVPPS-
AF175710	254	VNNQPIONRRTQMKLSLLEHQAADLLEICSDVIP--VFKTLIQAATFPAQISOADVEIVNAAPFFALSDPPVTAAPVPPS-
AF007223	248	VNNQPIONRRAATMSKMLLQDQKTKLICSDVIP--TPPALVGAHLPAGFSLSDVEQAC--AATFPALADPPGATSVAPVPPS-
AF007224	248	VNNQPIONRRAATMSKMLLQDQKTKLICSDVIP--TPPALVGAHLPAGFSLSDVEQAC--AATFPALADPPGATSVAPVPPS-
M27401	262	VNNQSLVDVDFQIFLALTLQSDPNAMTKCSDVIPQSKAPIGNLFFSFFPAGTKTIKVEQAC--AETFPFTLTPGATSVQRIPPP
M60672	259	VNEQAPMAASRAAMSLAVLGHNRNSLIEICSDVIP--VPKPATGCPAMFESTGPDLELSE--PSEPEPTLTPGASQSLIACPDG
DQ060037	350	-----
Ax217015	350	-----
AM039632	350	-----
AJ515245	350	-----
AF175710	350	-----
AF007223	350	-----
AF007224	350	-----
M27401	350	GA-----
M60672	345	SMSCPCGVQFNQPA

Figura 5.1. Alineamiento de las secuencias maduras de las peroxidasas versátiles de *Bjerkandera adusta* UAMH 8258 (DQ060037), *Bjerkandera sp.* B33/3 (AY217015), *Pleurotus sapidus* (AM039632), *Lepista irina* (AJ515245), *Pleurotus eryngii* PS1 (AF175710), *Pleurotus eryngii* VPL1 (AF007223) y *Pleurotus eryngii* VPL2 (AF007224); y la ligninasa (M27401) y manganeso (M60672) peroxidasas de *Phanerochaete chrysosporium*.

5. Relación funcional entre el Ca^{2+} y la actividad catalítica

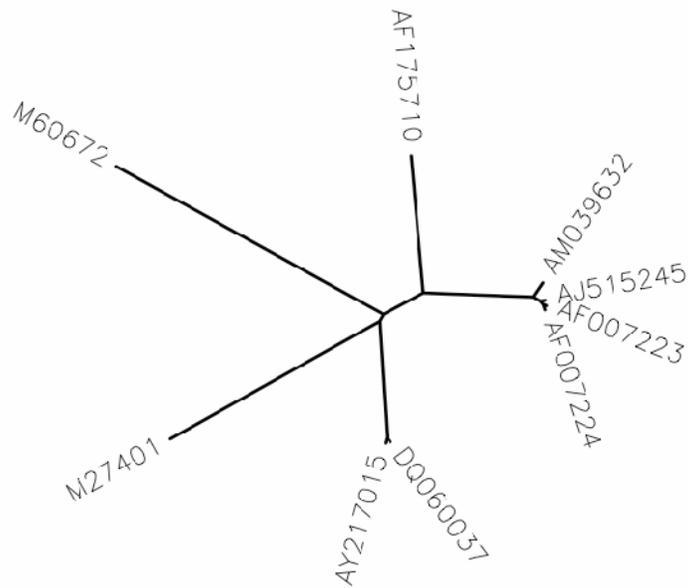


Figura 5.2. Relación filogenética de las secuencias maduras de las peroxidosas versátiles de *Bjerkandera adusta* UAMH 8258 (DQ060037), *Bjerkandera* sp. B33/3 (AY217015), *Pleurotus sapidus* (AM039632), *Lepista irina* (AJ515245) y *Pleurotus eryngii* PS1 (AF175710), VPL1 (AF007223) y VPL2 (AF007224); y la ligninasa (M27401) y manganeso (M60672) peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium*.

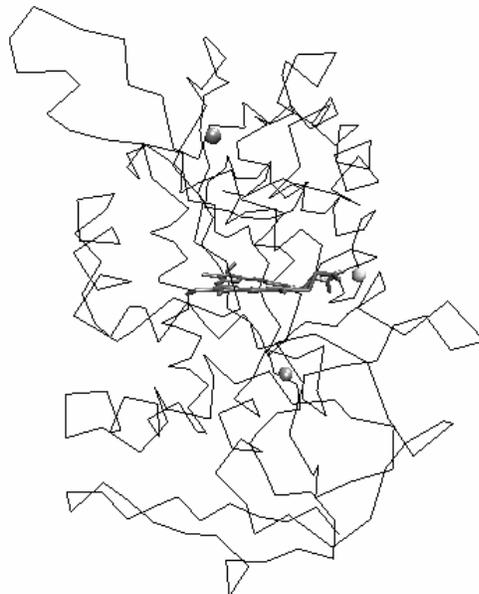


Figura 5.3. Modelo molecular de la peroxidasa versátil de *Bjerkandera adusta* UAMH 8258, obtenido por homología (Swiss-model) a partir de las estructuras cristalográficas de la peroxidasa versátil VPL2 de *Pleurotus eryngii* (PDB 2BOQ), y la lignino (PDB 1B80) y manganeso (PDB 1MNP) peroxidosas de *Phanerochaete chrysosporium*. La representación de trazas fue obtenida con VMD [109].

5. Relación funcional entre el Ca^{2+} y la actividad catalítica

de VPL2. El compuesto I oxida este residuo generando un radical que se estabiliza con la oxidación acoplada de un sustrato asequible [21-22, 37, 66]. A diferencia del ion Mn^{2+} que transfiere directamente un electrón al hemo a través del propionato al que está unido, W172 lo hace a través de una cadena de transferencia de electrones ya que no está en contacto directo con el grupo prostético. En LiP, M172 forma parte de esa cadena [66]; sin embargo, en la PV el aminoácido espacialmente equivalente es L173. Como lo prevenía el alineamiento (Figura 5.1), la PV contiene un par de sitios de unión a Ca^{2+} que flanquean la cavidad del hemo, justo por arriba y abajo de las histidinas distal y proximal. Los residuos que efectivamente se unen al Ca^{2+} son, en el lado distal, D49—inmediatamente adyacente a la H48 distal—, G67, A68, D69, G70 y S71; y S178—adyacente a la H177 proximal—, D195, S196, T197, P198, E199, I200, F201 y D202 en el lado proximal. El contenido de Ca^{2+} en la PV (2.31 ± 0.14 iones de Ca^{2+} por molécula de PV) medido por absorción atómica indica que estos sitios están efectivamente ocupados.

Tabla 5.1

Contenido de estructura secundaria de algunos miembros de la superfamilia de las peroxidasa de plantas^a

Peroxidasa	Dicroísmo circular		Estructura cristalográfica		PDB
	Hélices α , %	Hojas β , %	Hélices α , %	Hojas β , %	
PV^b	43.00	1.20	ND ^c	ND	ND
MnP	48.00	14.00	31.09	3.36	1MNP
LiP	50.00	7.90	34.19	4.56	1B85
HRP	44.10	1.80	44.77	1.96	1ATJ

^aEl contenido de estructura secundaria de cada peroxidasa fue estimado mediante dicroísmo circular. Para verificar la precisión del cálculo en la PV, los valores obtenidos para las otras peroxidasa se compararon con el contenido de estructura secundaria estimado a partir de sus estructuras cristalográficas.

^b Peroxidasa versátil de *Bjerkandera adusta* UAMH 8258.

^c ND, no disponible.

5.1.2 Relación actividad – Ca^{2+} estructural

La PV pierde actividad cuando se incuba en presencia de EDTA (Tabla 5.2). Congruente con la naturaleza del agente quelante usado, la desactivación de la PV correlaciona con el decremento de su contenido de Ca^{2+} . Éste pasa de 2.31 ± 0.14 Ca^{2+} /PV nativa a 0.22 ± 0.01 Ca^{2+} /PV inactiva. La PV descalcificada fue reconstituida en presencia de CaCl_2 , recuperando el 40.83 ± 0.88 % de la actividad original (Tabla 5.2). Esto demuestra que la actividad de la PV depende de sus Ca^{2+} estructurales. En otras peroxidasa de la clase II y III, como MnP, LiP y HRP, también se ha observado esa relación entre actividad y Ca^{2+} [4-5, 20]. Al igual que la PV, MnP y LiP de *P. chrysosporium* pierden el total de su actividad al descalcificarse por efecto térmico, alcalino o inducido por un agente quelante [65, 67-68]. En contraste, la HRP descalcificada sólo pierde actividad parcialmente [20, 70].

5. Relación funcional entre el Ca^{2+} y la actividad catalítica

Tabla 5.2

Dependencia de la actividad de la PV de sus Ca^{2+} estructurales		
PV	Actividad específica ^a , %	Ca^{2+} / molécula de PV
Nativa	100	2.31±0.14
Descalcificada ^b	AND ^d	0.22±0.01
Reconstituida ^c	40.83±0.88	ND ^e

^aLa actividad específica fue medida por oxidación de alcohol veratrílico y expresada como porcentaje con respecto a la actividad de la PV nativa.

^bLa descalcificación se realizó incubando PV en Tris 10 mM, EDTA 7.5 mM, pH 7.0 a 25°C hasta que la oxidación de alcohol veratrílico no fue detectada.

^cLa PV descalcificada se dializó contra Tris 20 mM, CaCl_2 0.1 M, pH 7.5 durante 96 h a 4°C.

^dAND, actividad no detectada.

^eND, no determinado.

La pérdida de actividad por descalcificación ha sido relacionada con el aumento de movilidad de las histidinas axiales [65, 67-68]. La posición relativa de estos residuos, regulada por los Ca^{2+} estructurales, influye en algunas de las más importantes propiedades de la enzima [37-66]. La histidina proximal es uno de los determinantes del potencial redox de la peroxidasa, mientras que la histidina distal está involucrada en la heterólisis ácido-base del H_2O_2 , paso necesario para iniciar el ciclo catalítico [40, 86-87]. A diferencia de la histidina proximal, la histidina distal no se coordina al Fe^{3+} del hemo [37, 66]. El modelo de desactivación más aceptado propone que, tras la pérdida de Ca^{2+} , la histidina distal gana flexibilidad y hexacoordina el Fe^{3+} del hemo. De este modo, la heterólisis del H_2O_2 se trunca (Figura 2.6) impidiendo el inicio del ciclo catalítico [65, 67-68]. Sin embargo, la formación del compuesto I en la HRP descalcificada contradice este modelo y las condiciones en las que fue obtenida la información que lo sustenta lo ponen en duda (pH 7.5 o superior) [65, 67-68].

5.1.3 El estado de “spin” de la PV nativa y descalcificada

Dentro de complejos octaédricos, la energía de los electrones en los orbitales d del Fe^{3+} (y de todos los metales de transición en las mismas circunstancias) es modificada por la repulsión que produce el acercamiento de los ligantes aniónicos [88]. Así, los cinco orbitales d , normalmente isoenergéticos, aumentan su energía y se dividen en dos grupos de dos (e_g) y tres orbitales (t_{2g}), los segundos con mayor energía que los primeros (Figura 5.4). La diferencia energética entre los orbitales e_g y t_{2g} depende de la fuerza de los ligantes aniónicos y se la conoce como energía de campo cristalino (Δ). La magnitud de esta energía determina las propiedades paramagnéticas del ión ya que influye en el número de electrones desapareados en los orbitales d . Siguiendo el principio de Hund, los electrones van ocupando los orbitales de menor energía hasta que todos quedan semillenos. Los electrones subsecuentes tienen dos alternativas: aparearse con uno de los electrones que ya

5. Relación funcional entre el Ca^{2+} y la actividad catalítica

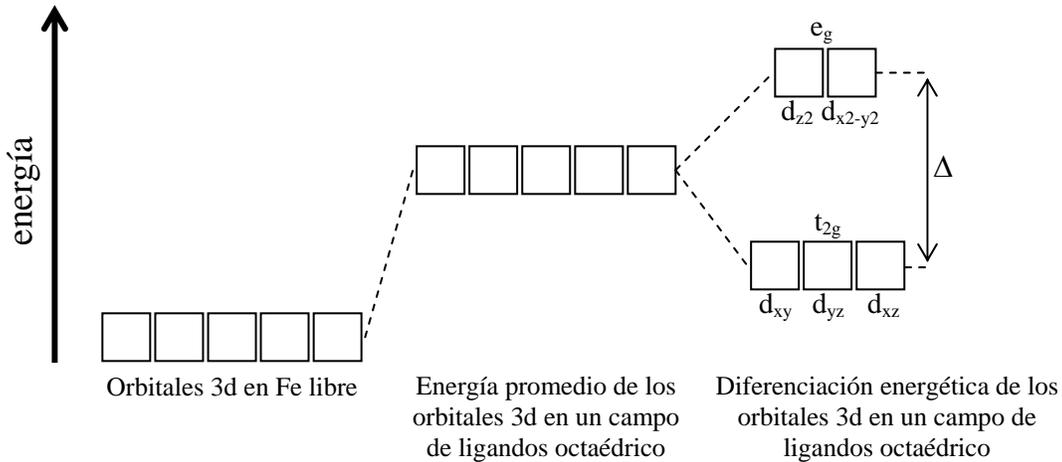


Figura 5.4. Diferenciación energética de los orbitales d del Fe dentro de un complejo octaédrico. La repulsión producida por el acercamiento de los ligantes aniónicos provoca el aumento de la energía promedio de todos los orbitales d . Debido a la aproximación axial de los ligantes, la repulsión es mayor con los orbitales d_{x^2} y $d_{x^2-y^2}$ que con los orbitales del grupo t_{2g} : d_{xy} , d_{yz} y d_{xz} , causa de la mayor energía de los primeros.

ocupan uno de los orbitales de baja energía y vencer la repulsión, u ocupar uno de los orbitales vacíos de energía superior en contra de la energía de campo cristalino. Si los ligandos del Fe^{3+} son fuertes, la energía de campo cristalino es demasiado grande y los electrones tenderán a ocupar los orbitales de menor energía, reduciéndose al mínimo el número de electrones desapareados. Esta configuración electrónica es conocida como de *spin* bajo (Figura 5.5). Por el contrario, cuando los ligantes son débiles la energía de campo cristalino es pequeña y fácilmente remontable por los electrones que tenderán a distribuirse por todos los orbitales disponibles, maximizando el número de electrones desapareados. Esta configuración electrónica es de *spin* alto (Figura 5.5). El Fe^{3+} del hemo puede sufrir transiciones electrónicas entre ambos estados dependiendo de la naturaleza y contexto estructural de sus ligantes axiales.

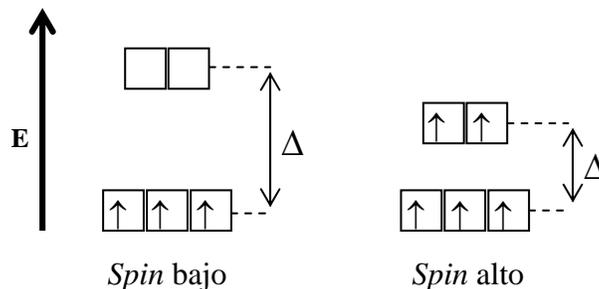


Figura 5.5. Distribución de los electrones en los orbitales $3d$ en configuración de *spin* bajo y alto. Δ , energía de campo cristalino determinada por la fuerza de los ligantes aniónicos que se aproximan al Fe para formar un complejo octaédrico.

5. Relación funcional entre el Ca^{2+} y la actividad catalítica

Para profundizar en las causas estructurales de la desactivación, el estado de *spin* del Fe^{3+} hemínico fue caracterizado para la PV nativa y descalcificada a pH 4.5, donde la enzima exhibe actividad máxima, y pH 7.5, para simular las condiciones probadas en otras peroxidases. Los espectros de absorción electrónica de la PV nativa y descalcificada se muestran en la Figura 5.6 y sus máximos se recopilan en la Tabla 5.3. A pH 7.5, el espectro de la PV nativa exhibe bandas a 588 nm (α), 541 nm (β) y 406.8 nm (Soret), así como dos bandas de transferencia de carga a 644.4 nm (CT1) y 498 nm (CT2). La disminución del pH a 4.5 no produjo grandes cambios espectrales con respecto a los observados a pH 7.5, salvo el desplazamiento de la banda CT1 a 635.2 nm. Esta banda, que sólo aparece en las peroxidases cuya configuración electrónica es de *spin* alto, corresponde a la transferencia de carga de la porfirina al hierro [89]. Su desplazamiento hacia el azul a pH ácido indica una configuración hexacoordinada de *spin* alto para el Fe^{3+} hemínico, siendo una molécula de agua el sexto ligante [90, 91]. Por otro lado, el espectro de la PV descalcificada a pH 7.5 muestra una notoria disminución de la banda Soret con respecto a la PV nativa, así como la completa desaparición de las dos bandas de transferencia de carga. Paralelamente, las bandas α y β aparecen más intensas y desplazadas a 563 nm y 523 nm, respectivamente; mientras que un nuevo hombro aparece alrededor de 350 nm. La desaparición de la banda CT1 del espectro de la PV descalcificada a pH 7.5 indica que el Fe^{3+} hemínico se encuentra hexacoordinado y en configuración de *spin* bajo. Además, las nuevas características de las bandas α y β sugieren que un átomo de nitrógeno, posiblemente de la histidina distal, actúa como sexto ligante [89, 90]. Un patrón espectral como éste fue observado para MnP y LiP después de ser descalcificadas, dando lugar al modelo de desactivación por hexacoordinación [67-68]. Sin embargo, el espectro de la PV descalcificada a pH 4.5 no es consistente con lo observado a pH 7.5. Bajo estas condiciones, el espectro conserva las bandas de transferencia de carga CT1 y CT2 con máximos en 637.8 nm y 498 nm, respectivamente, que indican que el Fe^{3+} hemínico permanece en un estado de *spin* alto a pesar de la pérdida de Ca^{2+} . Además de estas señales, el desplazamiento de la banda Soret hacia el azul (404 nm) y la intensificación del hombro a 350 nm también sugieren una configuración nativa de *spin* alto [89].

Tabla 5.3

Bandas de absorción electrónica de la PV nativa y descalcificada a pH 7.5 y 4.5

PV	CT1	α	β	CT2	Soret	otras
Nativa, pH 7.5	644.4	~ 588 h ^b .	~ 541 h.	498	406.8	ninguna
Descalcificada, pH 7.5	ninguna	~564 h.	523.4	ninguna	409.6	~ 350 h.
Nativa, pH 4.5	635.2	ninguna	~ 541 h.	498	406.4	ninguna
Descalcificada, pH 4.5	637.8	ninguna	~540 h.	498	404	~ 350 h.

^bh, hombro

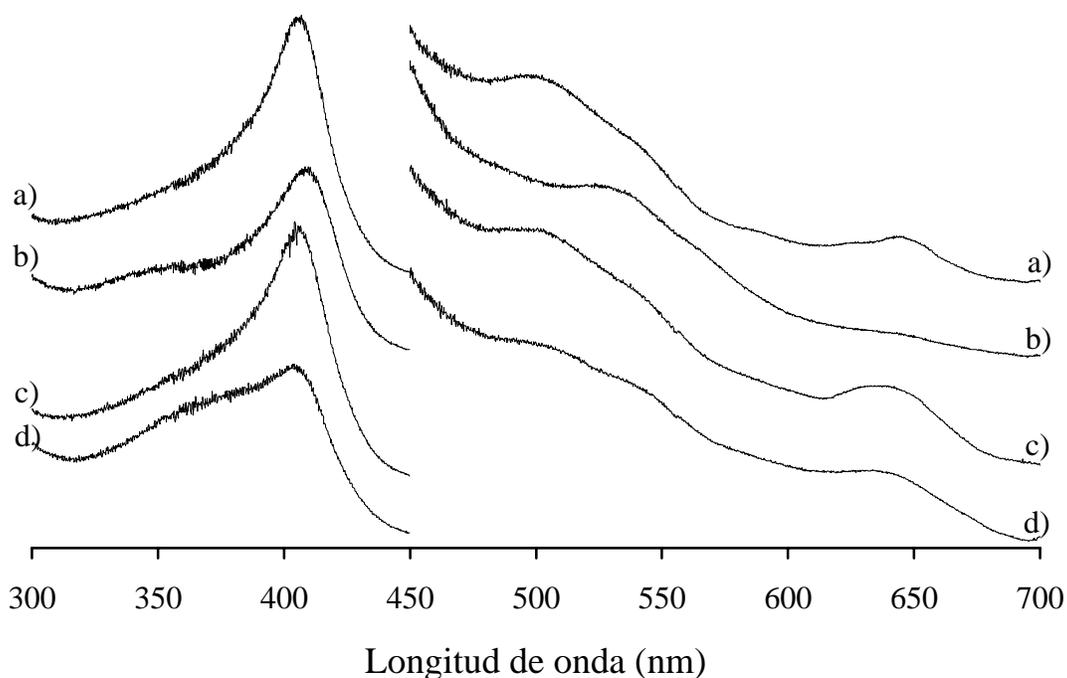


Figura 5.6. Espectros de absorción electrónica de la PV de *Bjerkandera adusta* nativa y descalcificada a pH 7.5 y pH 4.5. (a) Nativa, pH 7.5; (b) descalcificada, pH 7.5; (c) nativa, pH 4.5; y (d) descalcificada, pH 4.5. La región comprendida entre 450 nm y 750 nm fue amplificada siete veces. PV (12.94 μM) fue descalcificada en Tris 12 mM, EDTA 9 mM, pH 7.0 hasta que no fue detectada la oxidación de alcohol veratrílico. Antes de obtener los espectros, la mezcla de desactivación fue diluida cinco veces en regulador Tris 50 mM, pH 7.5 o citrato de sodio 50 mM, pH 4.5.

La configuración electrónica del Fe^{3+} hemínico también fue evaluada mediante resonancia paramagnética de electrones (EPR) de baja temperatura (Figura 5.7). El espectro de la PV nativa a pH 4.5 muestra señales mayoritarias de Fe^{3+} en configuración de *spin* alto ($g = 6.00$ y $g = 2.00$) [92]. Aunque en menor proporción, señales de *spin* bajo ($g = 3.15$ y $g = 2.07$) también están presentes en el espectro [92]. A pH 7.5, la PV tiene fundamentalmente el mismo espectro que el obtenido a pH 4.5, salvo que la proporción de especies de *spin* alto disminuye y la de *spin* bajo aumenta. Coincidiendo con lo observado en los espectros de absorción electrónica (Figura 5.6), el espectro de EPR de la PV descalcificada a pH 4.5 no muestra señales de Fe^{3+} en configuración de *spin* bajo, aunque las señales de *spin* alto ($g = 6.08$ y $g = 2.08$) son menos intensas que las observadas en la PV nativa. Por el contrario, el espectro de la PV descalcificada a pH 7.5 exhibe señales de *spin* bajo (minoritarias) en combinación con señales de *spin* alto menos intensas que las observadas para la enzima nativa.

La ausencia de señales de *spin* bajo, observada tanto en los espectros de absorción electrónica como en los de EPR, indica que la descalcificación no induce la hexacoordinación del Fe^{3+} hemínico a pH 4.5, descartando ese mecanismo como la causa de la pérdida de actividad. Sin embargo, el cambio de intensidad de la banda Soret y las señales de *spin* alto sí sugieren alteraciones conformacionales en la cavidad del hemo. Por

otro lado, la transición electrónica observada entre la PV nativa y la descalcificada a pH 7.5 podría ser inducida por el pH, ya que incluso la enzima nativa registra señales de *spin* bajo que están totalmente ausentes en la misma preparación a pH 4.5. En apoyo de lo anterior, los espectros de la MnP descalcificada muestran señales de *spin* bajo a pH alcalino que se debilitan fuertemente a pH 4.5 [67].

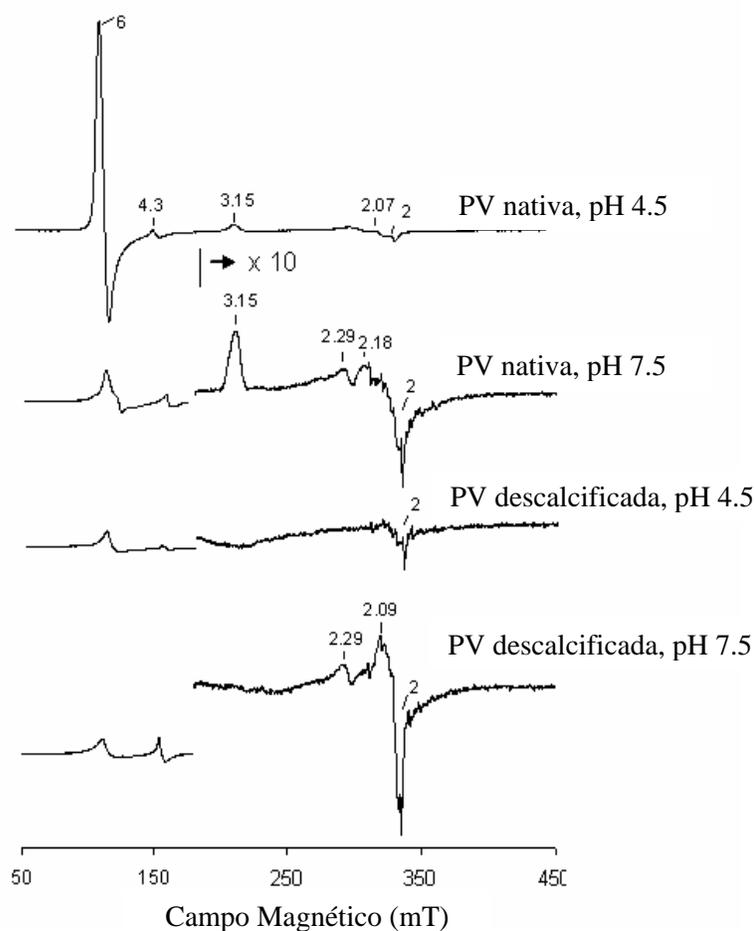


Figura 5.7. Espectros de resonancia paramagnética de electrones de baja temperatura (20 K) de la PV nativa y descalcificada a pH 4.5 y pH 7.5. En todos los casos, la concentración de enzima fue de 0.14 mM. Los espectros fueron obtenidos a 9.39 GHz, amplitud: 1 mT; potencia: 2 mW; frecuencia: 100 kHz.

5.1.4 Reacción de la PV descalcificada con H_2O_2 .

La adición de H_2O_2 1 mM decolora la banda Soret de la PV descalcificada tanto a pH 7.5 como a pH 4.5 (Figura 5.8). Las hemoperoxidasas autocatalizan su desactivación cuando reaccionan con H_2O_2 en ausencia de un sustrato exógeno oxidable, siendo la degradación

5. Relación funcional entre el Ca^{2+} y la actividad catalítica

del hemo una de sus principales características [3]. La decoloración irreversible de la banda Soret en la PV descalcificada indica la ruptura oxidativa del hemo. A pH 7.5, esto implica que el H_2O_2 es capaz de romper la ligadura entre la histidina distal y el Fe^{3+} hemínico—sugerida por la configuración hexacoordinada de *spin* bajo—, reaccionar con la peroxidasa y formar las especies reactivas de oxígeno que en última instancia son la causa de la degradación del hemo. En la HRP descalcificada también se ha observado que la hexacoordinación del Fe^{3+} hemínico es revertida fácilmente por moléculas que forman complejos con el Fe^{3+} [93]. Esto indica que bajo condiciones catalíticas ordinarias el enlace de coordinación entre el Fe^{3+} hemínico y la histidina distal es lo suficientemente frágil como para permitir el desplazamiento de la histidina por el H_2O_2 y garantizar la activación de este último por el Fe^{3+} . Como lo preveía su configuración electrónica, la PV descalcificada reacciona con el H_2O_2 a pH 4.5. A partir de estas observaciones es posible deducir que la inactividad de la PV descalcificada no es causada por la imposibilidad de reaccionar con el H_2O_2 , aun en el caso extremo y artificial de la hexacoordinación del Fe^{3+} hemínico.

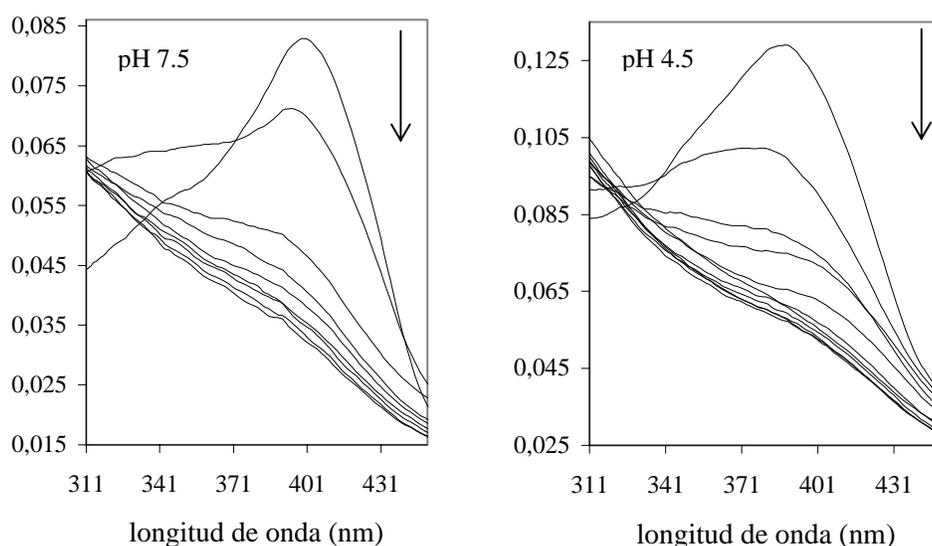


Figura 5.8. Decoloración de la PV descalcificada en presencia de H_2O_2 1 mM a pH 7.5 y 4.5. Los espectros se obtuvieron cada 3 min a 25 °C. Las flechas indican la dirección del cambio.

5.1.5 Cambios estructurales en la cavidad proximal del hemo.

A pesar de descartar la hexacoordinación del Fe^{3+} hemínico por la histidina distal como causa de la pérdida de actividad de la PV, tanto los espectros de absorción electrónica como los de resonancia paramagnética de electrones indican la modificación del ambiente estructural del hemo (Figuras 5.6 y 5.7). Para analizar la naturaleza de esos cambios, en particular los sucedidos en la cavidad proximal, se examinaron los espectros de fluorescencia de la PV nativa y descalcificada aprovechando que esta peroxidasa carece de

5. Relación funcional entre el Ca^{2+} y la actividad catalítica

tirosinas y sólo contiene dos triptófanos. Uno de ellos, W172, se encuentra en la superficie de la proteína, mientras que el segundo, W252, se encuentra completamente embebido y muy cercano al sitio proximal de unión a Ca^{2+} (2.97 Å del residuo más cercano del sitio de unión a Ca^{2+} , y a 10.72 Å del Ca^{2+}), resultando muy útil para monitorear cambios estructurales en esa zona de la proteína. El espectro de la PV nativa tiene su máximo de emisión en 337 nm ($\lambda_{\text{ex}}=295$ nm) y una intensidad considerablemente menor en comparación con la que muestra la PV descalcificada que, además, desplaza su máximo de emisión a 344.5 nm (Figura 5.9). Este desplazamiento hacia el rojo podría estar relacionado con un aumento de la polaridad del ambiente que rodea a los fluoróforos [94]. Sin embargo, el aumento de la intensidad es contradictorio con las reglas empíricas que sugieren el aumento de la polaridad [94]. Es posible que el aumento del rendimiento cuántico de la PV descalcificada con respecto a la nativa esté relacionado con la interrupción de la transferencia de energía entre los triptófanos y el hemo. Normalmente, las hemoproteínas exhiben rendimientos cuánticos bajos debido a que sus triptófanos emiten energía en el rango de longitudes de onda donde el hemo la absorbe, es decir, los triptófanos transfieren energía al hemo [95-97]. Dado que la eficiencia de la transferencia de energía depende de la distancia entre el donador y el aceptor [98], el aumento del rendimiento cuántico de la PV descalcificada puede deberse al cambio de las posiciones relativas y/o de la distancia de uno o ambos triptófanos con respecto al hemo inducido por la pérdida de Ca^{2+} . Partiendo de la expresión:

$$E = 1 - (Q_T/Q_O)$$

donde Q_T es la fluorescencia relativa de la peroxidasa en presencia del aceptor (hemo) y Q_O la fluorescencia relativa en ausencia de él [98], se estimó la eficiencia de la transferencia de energía de la PV nativa y descalcificada. Los triptófanos de la PV nativa transfieren su energía al hemo de manera muy eficiente, $E = 0.814$, mientras que en la descalcificada la eficiencia se reduce sensiblemente, $E = 0.503$. De los dos triptófanos del hemo, el W252 es el único estrechamente ligado a la cavidad proximal del hemo. Es posible que, tras la descalcificación, ese residuo—y toda la cavidad proximal—sufra un cambio conformacional que merme la transferencia de energía hacia el hemo produciendo el aumento observado del rendimiento cuántico de la enzima. Sin embargo, en este punto no es posible descartar una contribución del triptófano superficial, W172.

Para confirmar el cambio conformacional en la cavidad proximal del hemo tras la pérdida de Ca^{2+} , se examinó la exposición de los triptófanos antes y después de descalcificar la PV mediante un análisis de apagamiento de la fluorescencia [99, 100]. Utilizando acrilamida como apagador, la representación y las constantes de Stern-Volmer muestran que la fluorescencia de la PV descalcificada es apagada más fácilmente que la PV nativa, $K_{SV} = 8.55 \text{ M}^{-1}$ y $K_{SV} = 2.77 \text{ M}^{-1}$, respectivamente (Figura 5.10). Se puede observar que el apagamiento de la PV nativa sufre una desviación positiva inexistente en la PV descalcificada (Figura 5.10), lo que indica que en la primera la fluorescencia apagada tiene origen en un triptófano superficial [99], el W172. Esta observación fue confirmada ajustando los datos experimentales a la ecuación de Lehrer [101]:

$$F_0/\Delta F = 1/[Q]f_a K_{SV} + 1/f_a$$

5. Relación funcional entre el Ca^{2+} y la actividad catalítica

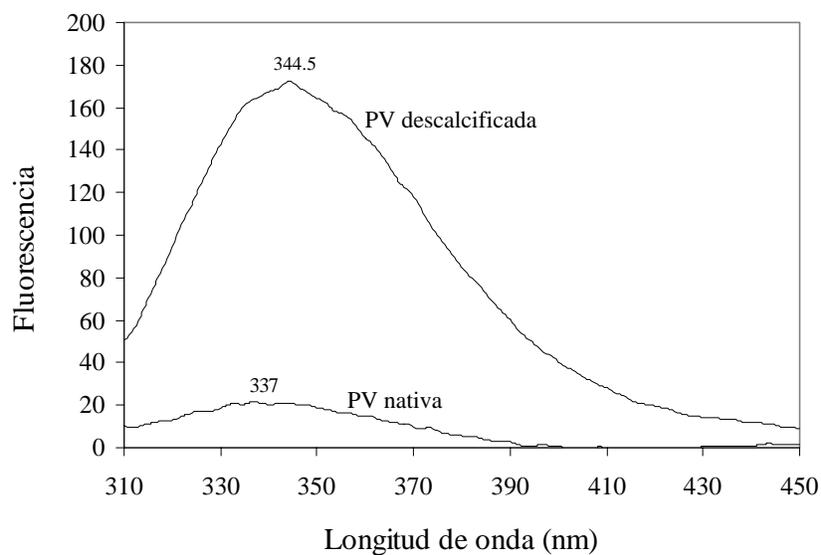


Figura 5.9. Espectro de fluorescencia de la PV nativa y descalcificada. Los espectros fueron obtenidos a 25 °C. Ex = 295 nm.

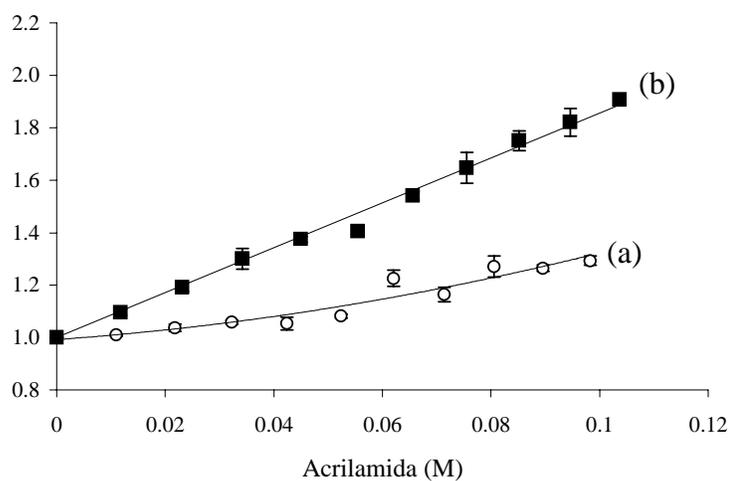


Figura 5.10. Representación de Stern-Volmer para el apagamiento de la fluorescencia de la PV (a) nativa y (b) descalcificada con acrilamida.

5. Relación funcional entre el Ca^{2+} y la actividad catalítica

para obtener la fracción de fluoróforos accesibles al apagador, f_a . Así, la fracción de triptófanos expuestos a la acrilamida en la PV nativa es tan solo de $f_a = 0.42$, mientras que en la PV descalcificada los dos triptófanos de la proteína son accesibles al apagador, $f_a = 1.02$. La ausencia de una desviación positiva en la curva de apagamiento de la PV descalcificada indica que, si bien el triptófano interno está lo suficientemente accesible como para permitir el acceso del apagador, no lo está tanto como para que el apagamiento estático, generador de las desviaciones, sea importante [99]. Tomando en cuenta que el W172 está totalmente expuesto al solvente, mientras que el W252 está aislado, la diferencia de las constantes de apagamiento de la PV antes y después de ser descalcificada sólo puede ser atribuible a cambios en la exposición del W252. Esto indica que la descalcificación, efectivamente, produce un cambio estructural en la cavidad proximal del hemo que altera la posición relativa del W252.

5.1.6 Reducción de la capacidad oxidante de la PV

El cambio de conformación de la cavidad proximal del hemo inevitablemente remite a la revisión de la capacidad oxidante de la enzima, ya que es en esta zona donde se encuentran los residuos que influyen en ella (histidina proximal) [66]. Los potenciales redox del par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ de la PV nativa y descalcificada fueron determinados a pH 4.5. La PV nativa tiene un potencial redox de 390 mV (ENH) que decrece hasta 190 mV en la muestra descalcificada. Tal como es característico de las hemoperoxidasas de la clase II, la PV nativa muestra un potencial redox muy positivo que explica su poder oxidante respecto de otras hemoproteínas. Ha sido propuesto que el potencial redox de las hemoperoxidasas es función tanto del carácter imidazolato de la histidina proximal como de la distancia de enlace entre ese residuo y el Fe^{3+} hemínico [40]. A mayor deficiencia de electrones en el hemo (menor carácter imidazolato de la histidina) se espera una menor estabilidad de los compuestos I y II y, consecuentemente, un potencial redox mayor. La notable reducción del potencial redox de la PV descalcificada confirma los cambios estructurales en la cavidad proximal sugeridos por los espectros de fluorescencia y el análisis de apagamiento (Figuras 5.9 y 5.10). Es posible que el carácter imidazolato de la histidina proximal haya aumentado al modificarse el patrón de puentes de hidrógeno al que está unido el residuo o, alternativamente, que se haya reducido la distancia de enlace entre la histidina proximal y el Fe^{3+} hemínico. Aunque la pareja $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ no está involucrada directamente en la reacción catalítica de las hemoperoxidasas, cambios del potencial redox en el mismo sentido podrían ser esperados para las parejas compuesto I/compuesto II y compuesto II/estado basal [70], sugiriendo que la inactividad de la PV descalcificada podría estar relacionada con un cambio en la capacidad oxidante de la enzima.

5.1.7 La PV descalcificada es incapaz de formar el radical triptofanilo

Coincidentemente, la PV descalcificada es incapaz de formar el radical triptofanilo que sostiene la actividad Mn^{2+} -independiente o ligninasa. En la Figura 5.11 se muestran los espectros de EPR de la PV nativa y descalcificada, además del espectro de la HRP, después

de la adición de H_2O_2 en un exceso molar de ocho veces con respecto a la concentración de proteína. Tal como había sido reportado previamente, la PV nativa forma un radical con $g_{\text{iso}} = 2.0027$ que ha sido asignado al W172 [21]. Este radical es estrictamente necesario para la oxidación del alcohol veratrílico y normalmente se forma cuando el compuesto I y II oxidan intramolecularmente al W172 [78]. Sin embargo, en la PV descalcificada no se observa esa señal y en su lugar aparecen otras con $g_{\parallel} = 2.3$ and $g_{\perp} \sim 2.00$. Estas señales son equiparables a las observadas en la HRP que, bajo las condiciones probadas, corresponden a las del radical catiónico π del compuesto I [92]. Estos resultados indican el aumento de la estabilidad del compuesto I y, además, su incapacidad para oxidar el triptófano superficial de la PV, lo que causa la carencia de actividad Mn^{2+} -independiente. Aunque no puede descartarse la contribución de cambios conformacionales que hayan alterado la vía de transferencia de electrones que permite la formación del radical, su abolición está más probablemente ligada a la reducción del poder oxidante de la enzima. En sustento de lo anterior, la oxidación de Mn^{2+} , absolutamente independiente del radical triptofanilo y ejecutada justo en el borde del hemo, también se ve seriamente afectada en la PV descalcificada. Esta forma de la enzima sólo conserva el 4.6 % de la actividad manganeso peroxidasa original. Como la PV descalcificada es capaz de reaccionar con el H_2O_2 para formar el compuesto I, y la interacción entre éste y el Mn^{2+} es directa, la drástica caída de la actividad sólo puede ser atribuible a la reducción de la capacidad oxidante de dicho intermediario, tal como lo sugiere la reducción del potencial redox de la enzima.

5.2 Conclusiones

La pérdida de los Ca^{2+} estructurales promueve la reconfiguración de la cavidad del hemo. En el lado distal, la histidina correspondiente se vuelve más flexible y, bajo condiciones de pH neutro o alcalino, hasta es capaz de hexacoordinar el Fe^{3+} del hemo sin evitar, por eso, la activación del H_2O_2 y el inicio del ciclo catalítico. Sin embargo, bajo condiciones de actividad óptima (pH 4.5), esa histidina no consigue ligar al Fe^{3+} , tal como lo indica la configuración de *spin* alto. En el lado opuesto de la cavidad, la histidina proximal también cambia de posición. Posiblemente aumenta su carácter imidazolato o se reduce la distancia de enlace entre ella y el Fe^{3+} . Esos cambios provocan la reducción del potencial redox de la enzima, lo que la inhabilita para formar el radical triptofanilo necesario para la actividad Mn^{2+} -independiente, así como para oxidar los sustratos de alto potencial de ionización que directamente interaccionan con el hemo.

5. Relación funcional entre el Ca^{2+} y la actividad catalítica

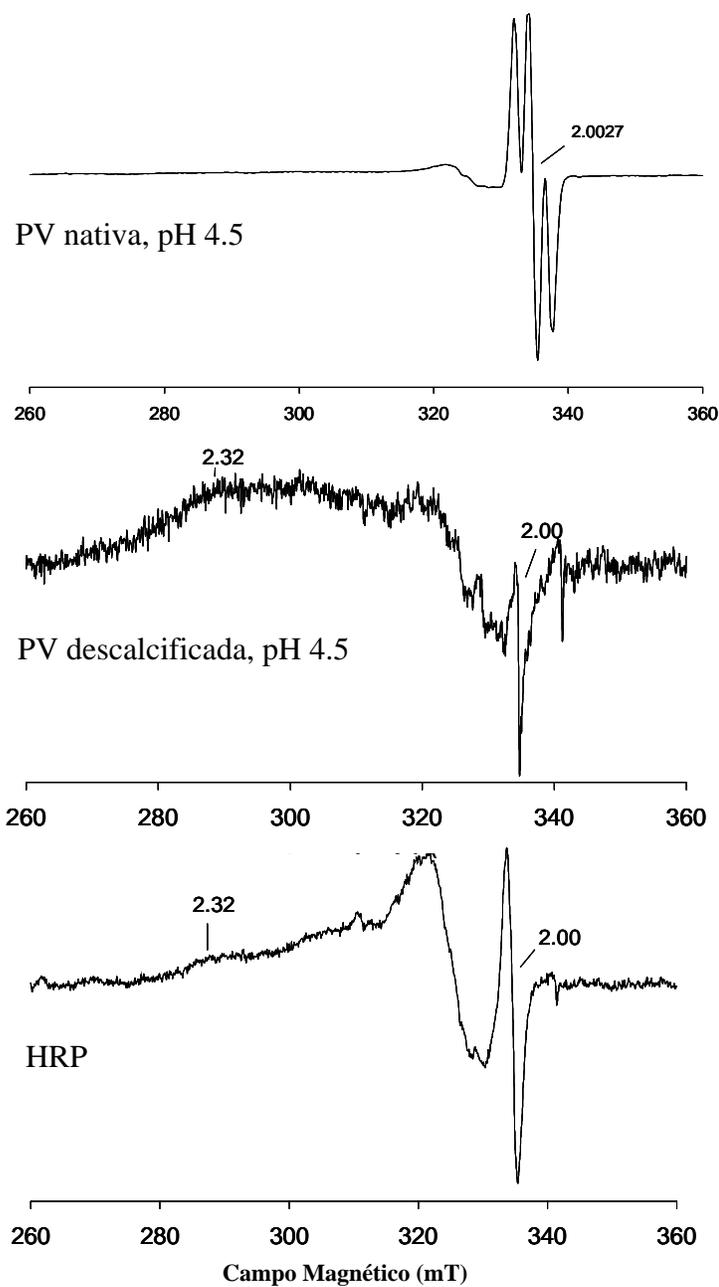


Figura 5.11. Espectros de EPR de la PV nativa, PV descalcificada y HRP obtenidos después de agregar ocho equivalentes de H_2O_2 a pH 4.5. Las condiciones instrumentales son las mismas que las de la figura 5.7.

6. El papel del Ca^{2+} y el W172 en la desactivación oxidativa

6.1 Resultados y discusión

6.1.1 Decaimiento de la actividad durante la desactivación oxidativa

Al igual que casi todas las hemoproteínas [3, 10, 13, 59], la PV es rápidamente desactivada por el H_2O_2 en ausencia de un sustrato oxidable. La desactivación fue evaluada siguiendo el decaimiento tanto de la actividad Mn^{2+} -dependiente como de la actividad Mn^{2+} -independiente (Figura 6.1). El decaimiento de ambas actividades está temporalmente diferenciado. Durante los primeros minutos, las dos proceden a la misma velocidad. Después, el decaimiento de la actividad Mn^{2+} -dependiente disminuye su velocidad mientras que la del decaimiento de la actividad Mn^{2+} -independiente se mantiene constante. Al final, las diferencias cinéticas son tales que la actividad Mn^{2+} -independiente desaparece por completo cuando la actividad Mn^{2+} -dependiente aun conserva el 40 % de su valor inicial (Figura 6.1).

La causa de la desactivación de las hemoperoxidasas ha sido históricamente atribuida a la degradación del hemo [3, 6]. Esto se ha inferido a partir de la observación de que la banda Soret asociada al grupo prostético se decolora durante la desactivación [3, 6]. También se ha observado que la degradación del hemo es más lenta que la pérdida de actividad, lo que ha sugerido el involucramiento de eventos deletéreos adicionales [6, 59]. En la PV, la destrucción del hemo fue seguida a través de la fluorescencia de sus productos de degradación. La cinética es esencialmente paralela al decaimiento de la actividad Mn^{2+} -dependiente, aunque a partir del minuto 5 hay un ligero desfase (Figura 6.1). Por el contrario, con respecto al decaimiento de la actividad Mn^{2+} -independiente, la degradación del hemo se retrasa significativamente a partir del minuto 3 (Figura 6.1). Las semejanzas de las cinéticas de decaimiento de la actividad Mn^{2+} -dependiente y la de degradación del hemo indican una relación cercana entre la pérdida de esa actividad y la destrucción del hemo. Sin embargo, las diferencias cinéticas entre el decaimiento de la actividad Mn^{2+} -dependiente y la degradación del hemo con el decaimiento de la actividad Mn^{2+} -independiente confirman la proposición de eventos deletéreos adicionales no hemínicos, al menos para esta última. Aun así, la divergencia cinética sólo empieza a partir del minuto 3; antes, el decaimiento de las dos actividades y la degradación del hemo son paralelos.

En las peroxidasas donde se ha observado un desfase cinético como el anterior, los sitios no hemínicos involucrados en la desactivación no han sido plenamente identificados. En el citocromo c se ha observado la oxidación de residuos de tirosina, cisteína y metionina (los más fácilmente oxidables en una proteína) [59]; sin embargo, la oxidación de esos residuos no desemboca en la pérdida de actividad [17], anulando cualquier posibilidad de que estén involucrados en el proceso de desactivación. Una estrategia más viable para encontrar los

6. El papel del Ca^{2+} y el W172 en la desactivación oxidativa

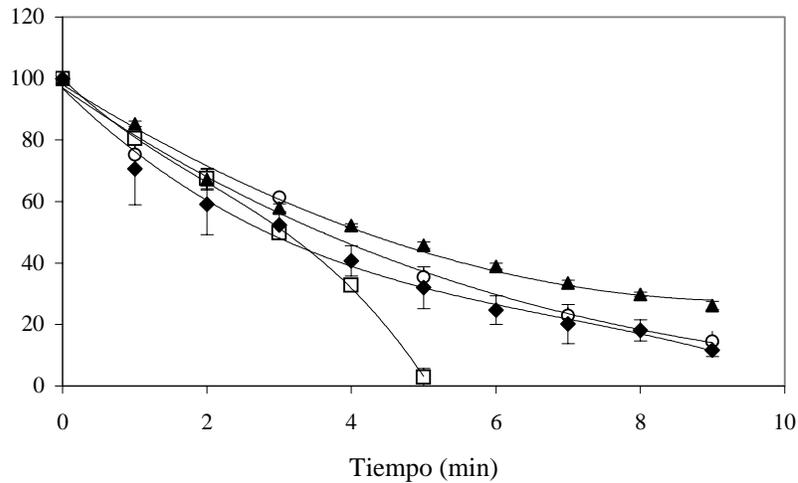


Figura 6.1. Desactivación oxidativa de la PV en presencia de H_2O_2 1 mM. Cinética de decaimiento de la actividad Mn^{2+} -independiente (\square), decaimiento de la actividad Mn^{2+} -dependiente (\circ), modificación de triptófanos (∇) y degradación del hemo (σ).

residuos protagonistas de los eventos deletéreos adicionales, es partir de la premisa de que tales residuos deben estar funcional y/o estructuralmente comprometidos. En la PV, residuos con esas características saltan a la vista. Éstos, incluso, están ligados de manera específica con alguna de las actividades. Para la actividad Mn^{2+} -dependiente, por ejemplo, se requiere de un sitio de unión a Mn^{2+} , integrado por los residuos E37, E41, D138 y uno de los propionatos del hemo, que es completamente prescindible para la actividad Mn^{2+} -independiente. Recíprocamente, la actividad Mn^{2+} -independiente, además de la necesidad obvia del hemo, requiere del residuo W172 para oxidar sus sustratos [21]. El decaimiento desfasado de ambas actividades bien podría radicar en una sensibilidad diferencial a las especies oxidantes producidas durante la desactivación, debida a las características particulares de los requisitos estructurales de cada actividad. Mientras que la actividad Mn^{2+} -dependiente es apagada por la destrucción del hemo, como lo sugiere la participación de uno de los propionatos en el sitio de unión a Mn^{2+} y lo indica la casi sincronía de las cinéticas de desactivación y de degradación del hemo, la actividad Mn^{2+} -independiente podría ser apagada tanto por la destrucción del grupo prostético como por la del W172. El involucramiento de este residuo en el proceso de desactivación no sólo es sugerido por su compromiso funcional, sino por su natural proclividad a oxidarse [102]. Hay que agregar que la pérdida de los Ca^{2+} estructurales, por daño al sitio de unión o a los residuos aledaños que pudieran desestabilizarlo, también podría ser parte del proceso de desactivación. La pérdida de esos iones, como se vio en el capítulo anterior, es causa de la reducción de la capacidad oxidante de la enzima y, en particular, de la abolición del radical catalítico centrado en el residuo W172, lo cual afectaría directamente el desempeño catalítico.

6.1.2 Pérdida de triptófano y Ca^{2+} durante la desactivación oxidativa.

Para probar la hipótesis anterior se cuantificó el contenido de triptófano y Ca^{2+} de la PV después de desactivarla con H_2O_2 en ausencia de sustrato exógeno. Al final del tratamiento, la PV conservó indemnes sólo el $55.8 \pm 1.0\%$ de sus triptófanos, es decir, de los dos que contiene, sólo uno es oxidado. Considerando el papel que juega durante el ciclo catalítico, es posible inferir que ese triptófano es el W172. Este residuo es selectivamente oxidado por los compuestos I y II para formar un radical triptofanilo que normalmente satisface el sustrato exógeno [21, 78]. En ausencia de éste, el radical sigue formándose [21] pero, como no es posible estabilizarlo, sufre una serie de reacciones que conducen a la modificación definitiva del triptófano [102]. De este modo, la oxidación del W172, mediada por el decaimiento del compuesto I al II, impide la actividad Mn^{2+} -independiente. Es improbable que el radical hidroxilo, generado a partir del compuesto III y responsable de la degradación del hemo [7, 9], tenga algún papel en la oxidación del W172. Debido a su gran reactividad, este radical actúa *in situ*, es decir, en o muy próximo al lugar donde se genera [55-56], en este caso, el grupo hemo. La cinética de modificación del W172 durante la desactivación oxidativa se muestra en la Figura 6.1. Por las razones discutidas anteriormente, en ella se asumió que el total de los triptófanos oxidados corresponden al W172. Se puede ver que la modificación de triptófanos sucede antes que la degradación del hemo (Figura 6.1). Esto soporta la idea de que los triptófanos son oxidados como consecuencia del decaimiento del compuesto I al II, ambos anteriores a la formación del compuesto III, la generación del radical hidroxilo y, por lo tanto, la degradación del hemo. Esta sucesión de eventos, sugerida por las cinéticas anteriores y el mecanismo de formación del compuesto III (Figura 2.3), indica que el daño al W172 no es un evento aditivo a la degradación del hemo, sino exclusivamente anterior. Debido a su compromiso funcional con la actividad Mn^{2+} -independiente, el daño adelantado sobre el W172 arrastra a aquella causando el desfase cinético observado. Sin embargo, la responsabilidad de la anticipación del decaimiento de la actividad Mn^{2+} -independiente no es exclusiva del daño al W172, ya que las cinéticas de ambos también se desfazan a partir del minuto 5, sugiriendo la participación de otros eventos en el aceleramiento del decaimiento de esa actividad.

Al igual que los triptófanos, el contenido de Ca^{2+} también decrece después de la desactivación. Pasa de 2.31 ± 0.14 iones/mol en la forma nativa a solo 0.94 ± 0.09 iones/mol en la forma inactiva. En principio, la pérdida de Ca^{2+} causaría la abolición de la actividad Mn^{2+} -independiente y mermaría la actividad Mn^{2+} -dependiente. Sin embargo, en este punto no es clara la forma cómo contribuiría en la pérdida de la actividad Mn^{2+} -dependiente, ya que el decaimiento de ésta parece muy ligada a la degradación del hemo. A diferencia de la modificación del W172, el mecanismo de liberación de Ca^{2+} no es obvio. Se podría especular que los sitios de unión de Ca^{2+} son dañados por las especies oxidantes producidas durante la desactivación; sin embargo, también es posible la desestabilización indirecta de dichos sitios a través del daño a elementos estructurales ligados a su estabilidad, como el hemo. Lo que sí parece claro es que la pérdida de Ca^{2+} es la respuesta a cambios estructurales específicos, tal como lo sugieren los espectros de dicroísmo circular (Figura 6.2). En estos, la PV oxidativamente desactivada conserva el patrón de una proteína plegada, con estructura secundaria formada mayoritariamente por hélices α , aunque, con

6. El papel del Ca^{2+} y el W172 en la desactivación oxidativa

respecto a la PV nativa, sí hay una disminución de la banda a 222 nm que se corresponde con una pérdida de dicho tipo de estructura.

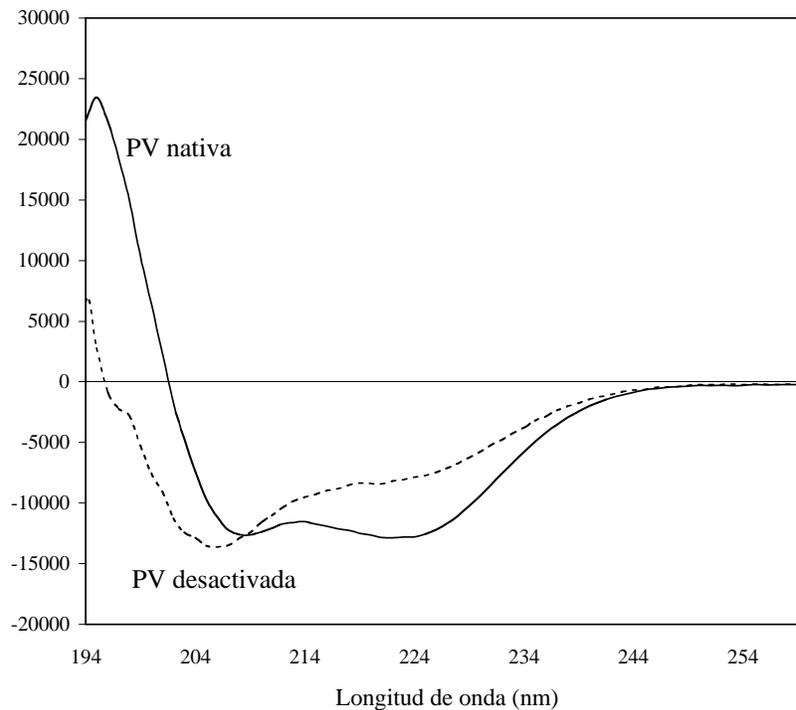


Figura 6.2 Espectros de dicroísmo circular de la PV nativa y desactivada con H_2O_2 .

6.1.3 Contexto temporal de la liberación de Ca^{2+}

Para verificar la temporalidad de la liberación de Ca^{2+} durante la desactivación oxidativa, se examinó el espectro de fluorescencia de la PV oxidada (Figura 6.3). Al igual que en la PV descalcificada (Figura 5.9), se observa un incremento considerable del rendimiento cuántico de la enzima con respecto a la intensidad de la PV nativa. Sin embargo, en la PV oxidada la disminución de la eficiencia de la transferencia de energía no sólo es atribuible a los cambios estructurales asociados a la pérdida de Ca^{2+} , como en la PV descalcificada, sino también a la degradación del aceptor de energía, el hemo. Teniendo esto en cuenta, se compararon las cinéticas del aumento de la fluorescencia intrínseca con las de los productos de degradación del hemo durante la desactivación oxidativa (Figura 6.4). El aumento de la fluorescencia intrínseca es notoriamente más rápido que la degradación del hemo. Si la liberación de Ca^{2+} estuviera ligada a la degradación del grupo prostético, la cinética de ésta y la del aumento de la fluorescencia intrínseca estarían sincronizadas. Como no pasa así, se puede inferir que hay cambios estructurales asociados a la liberación de Ca^{2+} previos a la degradación del hemo. Conforme la desactivación progresa, es posible que se forme una población con el hemo degradado que convive con otra que sólo ha perdido sus Ca^{2+} —pero que luego perderá el hemo—, además de una tercera población nativa. La velocidad diferencial observada entre el aumento de la fluorescencia intrínseca y la degradación del hemo sería la suma de ambas poblaciones. De la misma forma que la modificación del

6. El papel del Ca^{2+} y el W172 en la desactivación oxidativa

W172, la cinética de liberación de Ca^{2+} sugiere que sus sitios de unión, o residuos aledaños a ellos y de quien podría depender su estabilidad, podría estar ligada a la reducción del compuesto I.

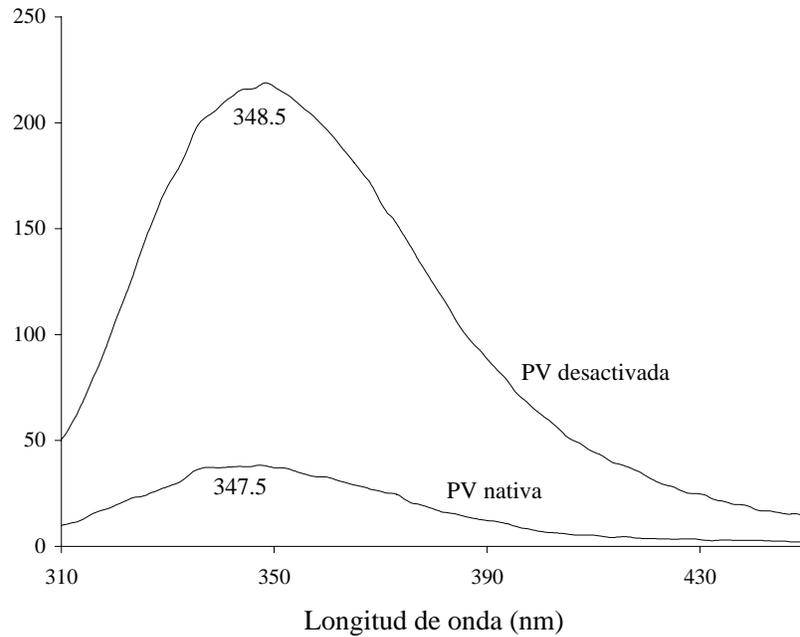


Figura 6.3 Espectros de fluorescencia de la PV nativa y oxidativamente desactivada. Los espectros fueron obtenidos a 25° C. $E_x = 295$ nm.

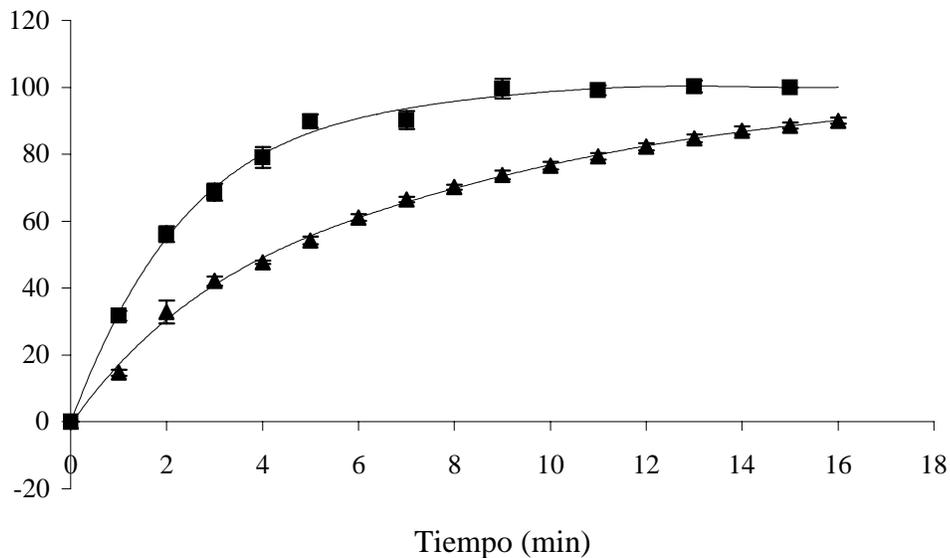


Figura 6.4. Incremento de la fluorescencia intrínseca, $E_x=295$ nm, $E_m=347$ nm (■) y la debida a los productos de degradación del hemo, $E_x=321$ nm, $E_m=447$ nm (▲) de la PV durante la desactivación oxidativa.

6.1.4 Esbozo del mecanismo de desactivación oxidativa de la PV

La desactivación oxidativa, además de involucrar el daño a varios sitios de la proteína, parece ser causada por más de una especie oxidante. En ausencia de un sustrato exógeno oxidable, la hemoperoxidasa reacciona normalmente con el H_2O_2 y genera el compuesto I (Figura 6.5). Este intermediario necesariamente debe oxidar un residuo endógeno para poder decaer en el compuesto II y, luego, dar lugar al compuesto III, causante tradicional de la desactivación. Tanto sus antecedentes dentro del ciclo catalítico como la cinética de su degradación durante la desactivación oxidativa, sugieren la oxidación del W172 por el compuesto I, lo que implica la pérdida de la actividad Mn^{2+} -independiente. El compuesto II generado tras la reducción del compuesto I podría volver a oxidar al W172 o cualquier otro aminoácido oxidable de la enzima, cerrando el ciclo catalítico a costa de sustratos endógenos (Figura 6.5). Dentro de esos aminoácidos oxidables podrían estar los que, después de modificados, causan la liberación de Ca^{2+} . Alternativamente, o después de agotarse las fuentes internas de electrones, el compuesto II reacciona con una molécula de H_2O_2 para desembocar en el compuesto III que, tras una serie de reacciones, genera el radical hidroxilo responsable de la destrucción del hemo.

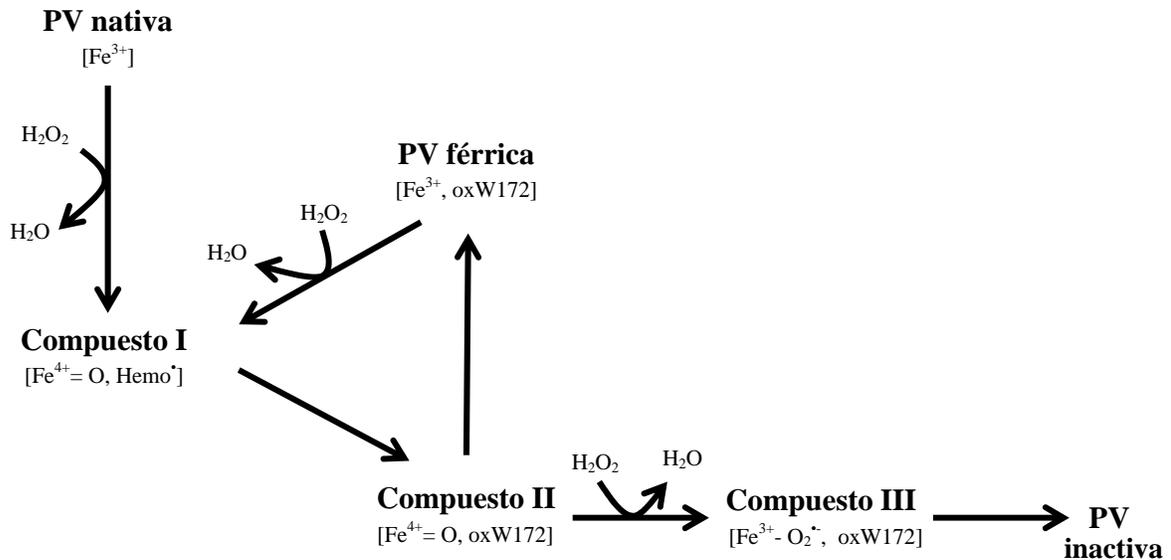


Figura 6.5. Esbozo del mecanismo de desactivación de la PV.

6.2 Conclusiones

Durante el proceso de desactivación oxidativa de la PV, además de la degradación del hemo, se observó la modificación del triptófano superficial W172 y la liberación de la mitad de los Ca^{2+} estructurales. La destrucción del hemo es mediada por los productos de degradación del compuesto III, mientras que la modificación del W172 y la liberación de

6. El papel del Ca^{2+} y el W172 en la desactivación oxidativa

Ca^{2+} está probablemente acoplada a la reducción del compuesto I. El compromiso funcional de ambos elementos estructurales con la actividad, en especial la Mn^{2+} -independiente, señalan su involucramiento en el proceso de desactivación.

7. Metodología

7.1 Materiales y reactivos

Ácido malónico, ácido succínico, acrilamida, alcohol veratrílico, BSA, guanidina y peróxido de hidrógeno fueron provistos por Sigma-Aldrich. Ácido cítrico, citrato de sodio, cloruro de calcio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, EDTA, fosfato de sodio mono- y dibásico, y sulfato manganoso los proveyó Baker. Ácido bicinconínico, ácido perclórico y tris(hidroximetil)aminometano fueron comprados a Pierce, Fluka y Amresco, respectivamente.

7.2 Modelo Molecular

La secuencia de la PV (GenBank: DQ060037) fue modelada por homología a través del servidor de Swiss-Model usando como planteados las estructuras cristalográficas de LiP (PDB: 1B85) y MnP (PDB: 1MNP) de *Phanerochaete chrysosporium*. El modelo no fue refinado después de obtener sus coordenadas.

7.3 Purificación de la PV

La purificación partió de una preparación parcialmente purificada de la PV ($R_Z = A^{407}/A^{280} = 0.7$), proporcionada por el Dr. Michael Pickard [103]. Esta preparación fue centrifugada (12100 g, 30 min., 4°C) y dializada contra amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 6.0 antes de ser cargada en una columna de DEAE-Sepharosa (Amersham) pre-equilibrada con el mismo amortiguador. La columna cargada fue lavada con NaCl 0.1 M antes de eluir a la enzima con un gradiente lineal de NaCl 0.1 – 0.4 M. El volumen total de la columna fue de 14 mL, el flujo del eluyente de 4 mL/min, mientras que los tiempos de lavado y elución fueron de 30 y 180 min., respectivamente. Las fracciones con el R_Z más alto (2.5-2.8) se mezclaron, concentraron y dializaron contra amortiguador de fosfatos 10 mM, NaCl 150 mM, pH 6.0. Estas fracciones fueron filtradas a través de una columna de Sephacryl-S-200-HR (Sigma-Aldrich) equilibrada en amortiguador de fosfatos 10 mM, NaCl 150 mM, pH 6.0. De nuevo, las fracciones con el R_Z más alto (≥ 3.0) se mezclaron y dializaron contra amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 6.0. La preparación final tuvo un $R_Z = 3.4$ y su pureza fue comprobada mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 12 %, teñido con AgNO_3 .

7.4 Ensayos enzimáticos

La actividad ligninasa (Mn^{2+} -independiente) fue medida siguiendo la producción de veratraldehído a 310 nm ($\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) durante la reacción del alcohol veratrílico 4 mM con H_2O_2 1 mM en amortiguador de succinatos 50 mM, pH 3.0 [104]. La actividad Mn^{2+} -peroxidasa (Mn^{2+} -dependiente) se midió monitoreando la formación del complejo Mn^{3+} -malonato a 270 nm ($\epsilon_{270} = 11590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en reacciones que contenían MnSO_4 0.1 mM y H_2O_2 1 mM en amortiguador de malonatos 50 mM, pH 4.5 [105].

La enzima agregada a las reacciones fue cuantificada por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay), empleando BSA como estándar.

7.5 Reacciones de desactivación

La PV (2.86 μM) fue oxidativamente desactivada por incubación con H_2O_2 (1 mM) en amortiguador de succinatos 50 mM, pH 3.0. Para la cinética de desactivación se extrajeron alícuotas de la mezcla desactivante cada que fue requerido y se determinó actividad ligninasa. Cuando el decaimiento de la actividad Mn^{2+} -dependiente fue monitoreado, la reacción de desactivación también se realizó en amortiguador de succinatos 50 mM, pH 3.0.

La cinética de desactivación mediada por EDTA fue ejecutada incubando PV 18.25 μM en Tris 20 mM, pH 7.5 suplementado con EDTA 0.15 mM. Cuando fue requerido, se extrajeron alícuotas de la mezcla desactivante y se les determinó actividad ligninasa. Para los experimentos de caracterización, las

7. Metodología

preparaciones de la PV descalcificada se obtuvieron incubando PV 12.94 μM en EDTA 9 mM, Tris 12 mM, pH 7.0 hasta que no fue detectada actividad ligninasa. La enzima descalcificada se reconstituyó dializándola contra CaCl_2 100 mM en Tris 20 mM, pH 7.5 durante 96 h a 4° C.

7.6 Espectroscopía de absorción electrónica

Todos los espectros se obtuvieron en un espectrofotómetro Beckman DU650 a 25° C en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 300 nm y 700 nm. Los espectros de la PV nativa y descalcificada se obtuvieron a pH 4.5 y pH 7.5. Cada preparación enzimática se disolvió en amortiguador de citratos 50 mM, pH 4.5 y Tris 50 mM, pH 7.5, hasta una concentración de 2.58 μM . Se verificó el pH final de cada solución.

La decoloración de la banda Soret se midió después de agregar H_2O_2 (1 mM) a la PV descalcificada (1.29 μM) predisolta en regulador de citratos 50 mM, pH 4.5 y Tris 50 mM, pH 7.5. Los espectros se obtuvieron cada 3 min durante alrededor de 30 min.

7.7 Resonancia paramagnética de electrones

Los espectros de EPR de baja temperatura (20 K) fueron obtenidos en colaboración con la Dra. Rebecca Pogni de la Universidad de Siena. Se utilizó un espectrómetro Bruker E500 Elexys Series acoplado a una cavidad Bruker ER 4122 SHQE y un criostato Oxford (ESR900) con flujo continuo de helio. Las condiciones operativas del espectrómetro fueron: ν , 9.39 GHz; amplitud, 1 mT; potencia, 2 mW y frecuencia, 100 kHz. Las muestras estuvieron compuestas por PV (0.14 mM) nativa o descalcificada disuelta en amortiguador de citratos 50 mM, pH 4.5 o Tris 50 mM, pH 7.5. La reacción de PV nativa y descalcificada con H_2O_2 (relación molar VP: H_2O_2 , 1:8) fue rápidamente parada por inmersión en nitrógeno líquido antes de obtener su espectro.

7.8 Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular fueron obtenidos en un espectropolarímetro Jasco J-720 a 25° C. Las preparaciones de la PV nativa y oxidada se diluyeron en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 6.0. Después, las muestras se filtraron a través de membranas con poros de 0.22 μm . La concentración de las soluciones finales se midió por el método del ácido bicinónico siendo 9.89 μM y 8.85 μM para la peroxidasa nativa y oxidada, respectivamente. Los espectros fueron analizados con el programa DICHROPROT V2.5 [106], utilizando datos sin suavizar en el intervalo 187-260 nm a una resolución de 1 nm.

7.9 Espectroscopía de fluorescencia

Los espectros de emisión ($E_x=295$ nm, $\text{abertura}_x=8$ nm; $\text{abertura}_m=4$ nm) de la PV (5.28 μM) nativa y descalcificada en amortiguador de citratos 50 mM, pH 4.5 fueron obtenidos en un espectrómetro Perkin-Elmer LS-50 Luminescence a 25° C. Para los experimentos de apagamiento, se agregó acrilamida de forma progresiva a las preparaciones de la PV nativa y descalcificada. Después de cada adición se midió la fluorescencia de la mezcla ($E_x = 295$ nm, $\text{abertura}_x = 8$ nm; $E_m = 347$ nm, $\text{abertura}_m = 4$ nm). A las intensidades medidas se les restó la intensidad basal y se ajustaron al cambio de concentración de proteína por efecto de la dilución. La opacidad debida a la acrilamida y a la propia proteína se corrigió empleando la expresión:

$$I_c = I_m \cdot 10^{[Abs^{295}]/2}$$

donde I_c es la intensidad corregida, I_m la intensidad experimentalmente medida y Abs^{295} la absorbancia de la muestra a 295 nm [107]. Sólo las absorbancias de la solución inicial (sin acrilamida) y final (con acrilamida) fueron medidas. Con estos puntos se construyó una curva [Acrilamida] vs. Abs^{295} con la que se infirió la absorbancia para las concentraciones intermedias de acrilamida.

Las intensidades corregidas se ajustaron a la ecuación de Stern-Volmer:

7. Metodología

$$F_o/F = 1 + K_{SV}[Q]$$

donde F_o es la fluorescencia en ausencia del apagador, F la fluorescencia en presencia del apagador, K_{SV} la constante de Stern-Volmer o de apagamiento y $[Q]$ la concentración del apagador [100]. Alternativamente, los datos también fueron ajustados a la ecuación de Lehrer [101]:

$$F_o/\Delta F = 1/[Q]f_a K_{SV} + 1/f_a$$

donde $\Delta F = (F_o - F)$ y f_a es la fracción de la fluorescencia accesible al apagador. Los otros términos tienen el mismo significado que en la ecuación de Stern-Volmer.

7.10 Potencial redox

PV nativa y descalcificada se disolvió en ácido cítrico 50 mM, pH 4.5 hasta una concentración de 78.68 μ M. El potencial de reducción de las soluciones se determinó utilizando un disco de platino como electrodo de trabajo, mientras que una barra de acero inoxidable fue usada como electrodo auxiliar. El electrodo de referencia fue un electrodo de Ag/AgCl. Como referencia interna se utilizó el par ferrocianuro/ferricianuro ($E = 0.356$ V/ENH).

7.11 Cuantificación de Ca^{2+}

El contenido de Ca^{2+} de la PV nativa, descalcificada y oxidada se determinó por absorción atómica. Las preparaciones de la enzima en sus tres formas fueron dializadas exhaustivamente contra H_2O grado milliQ y, posteriormente, digeridas con ácido perclórico para trazas. Las muestras digeridas se diluyeron en una solución de KCl 25 mM y ácido perclórico 0.35%. Las mediciones fueron hechas por triplicado en un espectrómetro Varian SpectrAA 220 utilizando una flama de acetileno/óxido nítrico. A todas las muestras se les restó la concentración basal de Ca^{2+} detectada en las muestras control.

7.12 Cuantificación del hemo

La degradación del hemo bajo estrés oxidativo se cuantificó monitoreando la fluorescencia de sus productos de oxidación en una reacción constituida por PV 2.86 μ M y H_2O_2 1 mM en amortiguador de succinatos 50 mM, pH 3.0 [108]. La fluorescencia de la mezcla a 447 nm ($E_x = 321$ nm) fue registrada a lo largo de la reacción. El ancho de banda de la excitación y la emisión fue de 10 nm. Los datos se expresaron como porcentaje de degradación del hemo asumiendo que la máxima fluorescencia estable obtenida correspondía a la totalidad de su pérdida. El método tradicional de la decoloración de la banda Soret fue descartado porque el bajo coeficiente de extinción del compuesto III, generado durante el proceso de desactivación, puede ser confundido con la decoloración del Soret por degradación del hemo.

7.13 Cuantificación de triptófanos

Para determinar el cambio del contenido de triptófanos en la PV durante el curso de su desactivación se extrajeron alícuotas de la mezcla oxidante y se diluyeron hasta una concentración de 0.22 μ M en regulador de fosfatos 10 mM, guanidina 6 M, pH 6.0. Con la fluorescencia ($E_x = 295$ nm, $E_m = 357$ nm) de cada muestra se calculó su contenido de triptófanos considerando que dos de ellos fluorescen tanto como la preparación nativa. En este caso, el ancho de banda de excitación y emisión fue de 8 nm y 4 nm, respectivamente. Las mediciones fueron hechas por triplicado en un espectrómetro Perkin-Elmer LS-50 Luminescence.

8. Referencias

1. F. van de Velde, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis, *Trends Biotech.* 19 (2001) 73-80.
2. A. Conesa, P.J. Punt, C.A.M.J.J. van den Hondel, Fungal peroxidases: molecular aspects and applications, *J. Biotechnol.* 93 (2002) 143-158.
3. H. Jenzer, W. Jones, H. Kohler, On the molecular mechanism of lactoperoxidase-catalyzed H₂O₂ metabolism and irreversible enzyme inactivation, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 15550-15556.
4. G.R.J. Sutherland, S.D. Aust, The effects of calcium on the thermal stability and activity of manganese peroxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* 332 (1996) 128-134.
5. G. Nie, S.D. Aust, Effect of calcium on the reversible thermal inactivation of lignin peroxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* 337 (1997) 225-231.
6. I. Weinryb, The behavior of horseradish peroxidase at high hydrogen peroxide concentrations, *Biochemistry* 5 (1966) 2003-2008.
7. M. Huwiler, H. Jenzer, H. Kohler, The role of compound III in reversible and irreversible inactivation of lactoperoxidase, *Eur. J. Biochem.* 158 (1986) 609-614.
8. H. Jenzer, H. Kohler, The role of superoxide radicals in lactoperoxidase-catalysed H₂O₂- metabolism and in irreversible enzyme inactivation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139 (1986) 327-332.
9. H. Jenzer, H. Kohler, C. Broger, The role of hydroxyl radicals in irreversible inactivation of lactoperoxidase by excess H₂O₂, *Arch. Biochem. Biophys.* 258 (1987) 381-390.
10. M.B. Arnao, M. Acosta, J.A. del Rio, R. Varon, F. García-Cánovas, A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide, *Biochim. Biophys. Acta* 1041 (1990) 43-47.
11. J.N. Rodríguez-López, J. Hernández-Ruiz, F. García-Cánovas, R.N.F. Thorneley, M. Acosta, M.B. Arnao, The inactivation and catalytic pathways of horseradish peroxidase with m-chloroperoxybenzoic acid, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 5469-5476.
12. S. Chen, P. Schopfer, Hydroxyl-radical production in physiological reactions, *Eur. J. Biochem.* 260 (1999) 726-735.
13. A.N.P. Hiner, J.N. Rodríguez-Lopez, M.B. Arnao, E. Lloyd-Raven, F. García-Cánovas, M. Acosta, Kinetic study of the inactivation of ascorbate peroxidase by hydrogen peroxide, *Biochem. J.* 348 (2000) 321-328.
14. A.N.P. Hiner, J. Hernández-Ruiz, J.N. Rodríguez-López, F. García-Cánovas, N. C. Brisset, A.T. Smith, M.B. Arnao, M. Acosta, Reactions of the class II peroxidases, lignin peroxidase and *Arthromyces ramosus* peroxidase, with hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 26879-26885.
15. A. Schmidt, J. T. Schumacher, J. Reichel, H.J. Hecht, U. Bilitewski, Mechanism and molecular investigations on stabilization of horseradish peroxidase C, *Anal. Chem.* 74 (2002) 3037-3045.
16. B. Valderrama, M. Ayala, R. Vazquez-Duhalt, Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes, *Chem. Biol.* 9 (2002) 555-565.
17. B. Valderrama, R. Vazquez-Duhalt, Electron-balance during the oxidative self-inactivation of cytochrome c, *J. Mol. Catal., B Enzym.* 35 (2005) 41-44.
18. H. Wariishi, M.H. Gold, Lignin peroxidase compound III, mechanism of formation and decomposition, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 2070-2077.
19. T.D. Pfister, A.J. Gengenbach, S. Syn, Y. Lu, The role of redox-active amino acids on compound I stability, substrate oxidation, and protection cross linking in yeast cytochrome c peroxidase, *Biochemistry* 40 (2001) 14942-14951.
20. R.H. Haschke, J.M. Friedhoff, Calcium-related properties of horseradish peroxidase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80 (1978) 1039-1042.
21. R. Pogni, M.C. Baratto, S. Giansanti, C. Teutloff, J. Verdin, B. Valderrama, F. Lenzian, W. Lubitz, R. Vazquez-Duhalt, R. Basosi, Tryptophan-based radical in the catalytic mechanism of versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*, *Biochemistry* 44 (2005) 4267-4274.
22. M. Ayala, M.C. Baratto, R. Basosi, R. Vazquez-Duhalt, R. Pogni, Spectroscopic characterization of a manganese-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera adusta* in the absence of manganese: evidence of a protein centred radical by hydrogen peroxide, *J. Mol. Catal., B Enzym.* 16 (2001) 159-167.
23. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology,

8. Referencias

- Enzyme Nomenclature. www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/
24. A. Butler, Vanadium haloperoxidases, *Curr. Opin. Biol. Chem.* 2 (1998) 279-285.
 25. J. Littlechild, Haloperoxidases and their role in biotransformation reactions, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3 (1999) 28-34.
 26. S. Colonna, N. Gaggero, C. Richelmi, P. Pasta, Recent biotechnological developments in the use of peroxidases, *TIBTECH* 17 (1999) 163-168.
 27. J.A. Bumpus, M. Tien, D. Wright, S.D. Aust, Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus, *Science* 228 (1985) 1434-1436.
 28. R. Vazquez-Duhalt, D.W.S. Westlake, P. Fedorak, Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 459-466.
 29. D. Wesenberg, I. Kyriakides, S.N. Agathos, White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents, *Biotechnol. Adv.* 22 (2003) 161-187.
 30. H. Kamitsuji, T. Watanabe, Y. Honda, M. Kuwahara, Direct oxidation of polymeric substrates by multifunctional manganese peroxidase isozyme from *Pleurotus ostreatus* without redox mediators, *Biochem J.* 386 (2005) 387-93.
 31. A. Breen, F.L. Singleton, Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping, *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 (1999) 252-258.
 32. M. Ayala, R. Tinoco, V. Hernandez, P. Bremauntz, R. Vazquez-Duhalt, Biocatalytic oxidation of fuel as an alternative to biodesulfuration, *Fuel Processing Technology* 57 (1998) 101-111.
 33. M. Ayala, N.R. Robledo, A. Lopez-Munguia, R. Vazquez-Duhalt, Substrate specificity and ionization potential in chloroperoxidase-catalyzed oxidation of diesel fuel, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 2804-2809.
 34. L.P. Hager, J.L. Frederick, A. Basavapathruni, Chiral synthons via chloroperoxidase catalysis, *J. Mol. Catal., B Enzym.* 5 (1998) 95-101.
 35. K. Piontek, T. Glumoff, K. Winterhalter, Low pH crystal structure of glycosylated lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.5 Å resolution, *FEBS Lett.* 315 (1993) 119-124.
 36. S.L. Edwards, R. Raag, H. Wariishi, M.H. Gold, T.L. Poulos, Crystal structure of lignin peroxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 750-754.
 37. W. Blodig, A.T. Smith, W.A. Doyle, K. Piontek, Crystal structures of pristine and oxidatively processed lignin peroxidase expressed in *Escherichia coli* and of the W171F variant that eliminates the redox active tryptophan 171. Implications for the reaction mechanism, *J. Mol. Biol.* 305 (2001) 851-861.
 38. R.E. Whitam, R.S. Koduri, M. Natan, M. Tien, Role of axial ligands in the reactivity of Mn peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, *Biochemistry* 38 (1999) 9608-9616.
 39. K.G. Welinder, Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2 (1992) 388-393.
 40. C.D. Millis, D. Cai, M.T. Stankovich, M. Tien, Oxidation-reduction potentials and ionization states of extracellular peroxidases from the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Biochemistry* 28 (1989) 8484-8489.
 41. G.R.J. Sutherland, S.D. Aust, Thermodynamics of binding of the distal calcium to manganese peroxidase, *Biochemistry* 36 (1997) 8567-8573.
 42. T.L. Poulos, S.L. Edwards, H. Wariishi, M.H. Gold, Crystallographic refinement of lignin peroxidases at 2Å, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 4429-4440.
 43. J. Zeng, R.E. Fenna, X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3Å resolution, *J. Mol. Biol.* 226 (1992) 185-207.
 44. K.S. Booth, S. Kimura, H.C. Lee, M. Ikeda-Saito, W. S. Caughey, Bovine myeloperoxidase and lactoperoxidase each contain a high affinity site for calcium, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160 (1989) 897-902.
 45. M. Sundaramoorthy, J. Turner, T. Poulos, The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid, *Structure* 3 (1995) 1367-1377.
 46. M. Gajhede, D. J. Schuller, A. Henriksen, A.T. Smith, T. Poulos, Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution, *Nat. Struct. Biol.* 4 (1997) 1032-1038.
 47. A. Henriksen, O. Mirza, C. Indiani, K. Teilum, G. Smulevich, K.G. Welinder, M. Gajhede, Structure of soybean seed coat peroxidase: a plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions, *Protein Sci.* 10 (2001) 108-115.
 48. A.N.P. Hiner, E.L. Raven, R.N.F. Thorneley, F. García-Cánovas, J.N. Rodríguez-López, Mechanism

8. Referencias

- of compound I formation in heme peroxidases, *J. Inorg. Biochem.* 91 (2002) 27-34.
49. P. Jones, Roles of water in heme peroxidase and catalase mechanism, *J. Bio. Chem.* 276 (2001) 13791-13796.
 50. A. Khindaria, S.D. Aust, EPR detection and characterization of lignin peroxidase porphyrin pi-cation radical, *Biochemistry* 35 (1996) 13107-13111.
 51. H.B. Dunford, *Heme Peroxidases*, Wiley-VCH, New York 1999.
 52. P. George, The third intermediate compound of horseradish peroxidase and hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.* 201 (1953) 427-434.
 53. G. Berglund, G. Carlsson, A.T. Smith, H. Szöke, A. Henriksen, J. Hajdu, The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution, *Nature* 417 (2002) 463-468.
 54. W.H. Koppenol, The Haber-Weiss cycle - 70 years later, *Redox Rep.* 6 (2001) 229-234.
 55. W. Pryor, Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions, *Ann. Rev. Physiol.* 48 (1986) 657-667.
 56. E. Cadenas, Biochemisry of oxygen toxicity, *Annu. Rev. Biochem.* 58 (1989) 79-110.
 57. I.I. Karuzina, V.G. Zgoda, G.P. Kuznetzova, N.F. Samenkova, A.I. Archakov, Heme and apoprotein modification of cytochrome P450 2B4 during its oxidative inactivation in monooxygenase reconstituted system, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 620-632.
 58. A. Hiner, J.I. Martínez, M.B. Arnao, M. Acosta, D.D. Turner, E.L. Raven, J.N. Rodríguez-López, Detection of a tryptophan radical in the reaction of ascorbate peroxidase with hydrogen peroxide, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 3091-3098.
 59. J.A. Villegas, A.G. Mauk, R. Vazquez-Duhalt, A cytochrome c variant resistant to heme degradation by hydrogen peroxide, *Chem. Biol.* 7 (2000) 237-244.
 60. R. Nakajima, I. Yamazaki, The conversion of horseradish peroxidase c to a verdohemoprotein by a hydrogen derived enzymatically from indole-3-acetic acid and by m-nitroperoxybenzoic acid, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 2067-2071.
 61. R. Nakajima, I. Yamazaki, The mechanism of oxyperoxidase formation from ferryl peroxidase and hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 2576-2581.
 62. A. Hiner, J. Hernández-Ruiz, F. García-Cánovas, A.T. Smith, M.B. Arnao, M. Acosta, A comparative study of the inactivation of wild-type, recombinant and two mutant horseradish isoenzyme c by hydrogen peroxide and m-chloroperoxybenzoic acid, *Eur. J. Biochem.* 234 (1995) 506-512.
 63. J. Hernandez-Ruiz, M.B. Arnao, A. Hiner, F. García-Cánovas, M. Acosta, Catalase-like activity of horseradish peroxidase: relationship to enzyme inactivation by H₂O₂, *Biochem. J.* 354 (2001) 107-114.
 64. A. Hiner, J. Hernández-Ruiz, A.G. Williams, M.B. Arnao, F. García-Cánovas, M. Acosta, Catalase-like oxygen production by horseradish peroxidase must predominantly be an enzyme-catalyzed reaction, *Arch. Biochem. Biophys.* 392 (2001) 295-302.
 65. P. George, M. Kvaratskhelia, M.J. Dilworth, R.N.F. Thorneley, Reversible alkaline inactivation of lignin peroxidase involves the release of both the distal and proximal site calcium ions and bishistidine co-ordination of the haem, *Biochem. J.* 344 (1999) 237-244.
 66. T. Choinowski, W. Blodig, K.H. Winterhalter, K. Piontek, The crystal structure of lignin peroxidase at 1.7 Å resolution reveals a hydroxy group on the C-Beta of tryptophan 171: a novel radical site formed during the redox cycle, *J. Mol. Biol.* 286 (1999) 809-827
 67. G.R.J. Sutherland, L. Schick Zapanta, M. Tien, S.D. Aust, Role of calcium in maintaining the heme environment of manganese peroxidase, *Biochemistry* 36 (1997) 3654-3662.
 68. G. Nie, S.D. Aust, Spectral changes of lignin peroxidase during reversible inactivation, *Biochemistry* 36 (1997) 5113-5119.
 69. S. Ogawa, Y. Shiro, I. Morishima, Calcium binding by horseradish peroxidase c and the heme environmental structure, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90 (1979) 674-678.
 70. Y. Shiro, M. Kurono, I. Morishima, Presence of endogenous calcium ion and its functional and structural regulation in horseradish peroxidase, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 9382-9390.
 71. Q. Huang, M. Laberge, K. Szigeti J. Fidy, R. Schweitzer-Stenner, Resonance Raman spectroscopy study of change of iron spin state in horseradish peroxidase c induced by removal of calcium, *Biopolymers* 72 (2003) 241-248.
 72. M. Laberge, Q. Huang, R. Schweitzer-Stenner, J. Fidy, The endogenous calcium ions of horseradish peroxidase c are required to maintain the functional nonplanarity of the heme, *Biophys. J.* 84 (2003)

8. Referencias

- 2542-2552.
73. M. Laberge, K. Sigeti, J. Fidy, The charge transfer band in horseradish peroxidase correlates with heme in-plane distortions induced by calcium removal, *Biopolymers* 74 (2004) 41-45.
 74. J.A. Shelnett, X.Z. Song, J.G. Ma, S.L. Jia, W. Jenzer, C.J. Medforth, Nonplanar porphyrins and their significance in proteins, *Chem. Soc. Rev.* 27 (1998) 31-41.
 75. M.J. Martínez, F.J. Ruiz-Dueñas, F. Guillén, A.T. Martínez, Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*, *Eur. J. Biochem.* 237 (1996) 424-432.
 76. A. Heinfling, M.J. Martínez, A.T. Martínez, M. Bergbauer, U. Szewzyk, Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*, *FEMS Microbiol. Lett.* 165 (1998) 43-50.
 77. T. Mester, J.A. Field, Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 15412-15417.
 78. M. Pérez-Boada, F.J. Ruiz-Dueñas, R. Pogni, R. Basosi, T. Choinowski, M.J. Martínez, K. Piontek, A.T. Martínez, Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways, *J. Mol. Biol.* 354 (2005) 385-402.
 79. W. Blodig, A.T. Smith, K. Winterhalter, K. Piontek, Evidence from spin-trapping for a transient radical on tryptophan residue 171 of lignin peroxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* 370 (1999) 86-92.
 80. P.R. Moreira, C. Duez, D. Dehareng, A. Antunes, E. Almeida-Vara, J.M. Frère, F.X. Malcata, J.C. Duarte, Molecular characterization of a versatile peroxidase from a *Bjerkandera* strain, *J. Biotechnol.* 118 (2005) 339-352.
 81. H. Zorn, S. Langhoff, M. Scheibner, M. Nimtz, R.G. Berger, A peroxidase from *Lepista irina* cleaves β , β -carotene to flavor compounds, *Biol. Chem.* 384 (2003) 1049-1056.
 82. S. Camarero, F.J. Ruiz-Dueñas, S. Sarkar, M.J. Martínez, A.T. Martínez, The cloning of a new peroxidase found in lignocellulose cultures of *Pleurotus eryngii* and sequence comparison with other fungal peroxidases, *FEMS Microbiol. Lett.* 191 (2000) 37-43.
 83. F.J. Ruiz-Dueñas, M.J. Martínez, A.T. Martínez, Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*, *Mol. Microbiol.* 31 (1999) 223-235.
 84. L. Banci, Structural properties of peroxidases, *J. Biotechnol.* 53 (1997) 253-263.
 85. D.N. Beratan, S.S. Skourtis, Electron transfer mechanism, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2 (1998) 235-243.
 86. G.R. Moore, G.W. Pettigrew, N.K. Rogers, Factors influencing redox potentials of electron transfer proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 4998-4999.
 87. L. Banci, I. Bertini, P. Turano, M. Tien, T.K. Kirk, Proton NMR investigation into the basis for the relatively high redox potential of lignin peroxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 6956-6960.
 88. M.S. Silverberg, Chemistry, The molecular nature of matter and change, 2nd edition, McGraw-Hill, 2000.
 89. G. Smulevich, Understanding heme cavity structure of peroxidases: comparison of electronic absorption and resonance Raman spectra with crystallographic results, *Biospectroscopy* 4 (1998) S3-S17.
 90. G. Smulevich, M.A. Miller, J. Kraut, T.G. Spiro, Conformational change and histidine control of heme chemistry in cytochrome c peroxidase: resonance Raman evidence from Leu-52 and Gly-181 mutants of cytochrome c peroxidase, *Biochemistry* 30 (1991) 9546-9558.
 91. G. Smulevich, F. Neri, M.P. Marzocchi, K.G. Welinder, Versatility of heme coordination demonstrated in a fungal peroxidase. Absorption and resonance Raman studies of *Coprinus cinereus* peroxidase and the Asp245:Asn mutant at various pH values, *Biochemistry* 35 (1996) 10576-10585.
 92. A. Ivancich, G. Mazza, A. Desbois, Comparative electron paramagnetic resonance study of radical intermediates in turnip peroxidase isozymes, *Biochemistry* 40 (2001) 6860-6866.
 93. B.D. Howes, A. Feis, L. Raimondi, C. Indiani, G. Smulevich, The critical role of the proximal calcium ion in the structural properties of horseradish peroxidase, *J Biol. Chem.* 276 (2001) 40704-40711.
 94. D. Freifelder, Physical Biochemistry, 2nd edition, Freeman and Co., New York, 1982
 95. J.E. Brunet, G.A. Gonzalez, C.P. Sotomayor, Intramolecular tryptophan heme energy transfer in

8. Referencias

- horseradish peroxidase, *Photochem. Photobiol.* 38 (1983) 253-254.
96. H.S. Pappa, A.E.G. Cass, A step towards understanding the folding mechanism of horseradish peroxidase. Tryptophan fluorescence and circular dichroism equilibrium studies, *Eur. J. Biochem.* 212 (1993) 227-235.
 97. T.K. Das, S. Mazumdar, pH-induced conformational perturbation in horseradish peroxidase. Picosecond tryptophan fluorescence studies on native and cyanide-modified enzymes, *Eur. J. Biochem.* 227 (1995) 823-828.
 98. L. Stryer, Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler, *Ann. Rev. Biochem.* 47 (1978) 819-846.
 99. M.R. Eftink, C.A. Ghiron, Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies, *Biochemistry* 15 (1976) 672-680.
 100. M.R. Eftink, C.A. Ghiron, Fluorescence quenching studies with proteins, *Anal. Biochem.* 114 (1981) 199-227.
 101. S. Lehrer, Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophanyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion, *Biochemistry* 10 (1971) 3254-3263.
 102. M.J. Davies, R.T. Dean, Radical mediated protein oxidation. From chemistry to medicine, Oxford Science Publications, New York, 1997.
 103. Y. Wang, R. Vazquez-Duhalt, M.A. Pickard, Purification, characterization, and chemical modification of manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* UAMH 8258, *Curr. Microbiol.* 45 (2002) 77-87.
 104. M. Tien, T.K. Kirk, Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, *Meth. Enzymol.* 161 (1988) 238-249.
 105. H. Wariishi, K. Valli, M. Gold, Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 23688-23695.
 106. G. Deleage, C. Geourjon, An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from circular dichroism spectrum, *Comput. Appl. Biosci.* 9 (1993) 197-199.
 107. J.R. Lakowicz, B.P. Maliwal, H. Cherek, A. Balter, Rotational freedom of tryptophan residues in proteins and peptides, *Biochemistry* 22 (1983) 1741-52.
 108. E. Nagababu, J.M. Rifkind, Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247 (1998) 592-596.
 109. W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 33-38.



Biophysical Chemistry 121 (2006) 163–170

Biophysical
Chemistry<http://www.elsevier.com/locate/biophyschem>

Mechanism of versatile peroxidase inactivation by Ca^{2+} depletion

Jorge Verdín^a, Rebecca Pogni^b, Alejandro Baeza^c, M. Camilla Baratto,
Riccardo Basosi^b, Rafael Vázquez-Duhalt^{a,*}

^a Institute of Biotechnology, UNAM, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

^b Department of Chemistry, University of Siena, via Aldo Moro, 53100, Siena, Italy

^c School of Chemistry, UNAM, Mexico, D.F. 04510, Mexico

Received 7 December 2005; received in revised form 13 January 2006; accepted 16 January 2006

Abstract

Versatile peroxidase (VP) from *Bjerkandera adusta*, as other class II peroxidases, is inactivated by Ca^{2+} depletion. In this work, the spectroscopic characterizations of Ca^{2+} -depleted VP at pH 4.5 (optimum for activity) and pH 7.5 are presented. Previous works on other ligninolytic peroxidases, such as lignin peroxidase and manganese peroxidase, have been performed at pH 7.5; nevertheless, at this pH these enzymes are inactive independently of their Ca^{2+} content. At pH 7.5, UV-Vis spectra indicate a heme- Fe^{3+} transition from 5-coordinated high-spin configuration in native peroxidase to 6-coordinated low-spin state in the inactive Ca^{2+} -depleted form. This Fe^{3+} hexa-coordination has been proposed as the origin of inactivation. However, our results at pH 4.5 show that Ca^{2+} -depleted enzyme has a high spin Fe^{3+} . EPR measurements on VP confirm the differences in the Fe^{3+} spin states at pH 4.5 and at 7.5 for both, native and Ca^{2+} -depleted enzymes. In addition, EPR spectra recorded after the addition of H_2O_2 to Ca^{2+} -depleted VP show the formation of compound I with the radical species delocalized on the porphyrin ring. The lack of radical delocalization on an amino acid residue exposed to solvent, W170, as determined in native enzyme at pH 4.5, explains the inability of Ca^{2+} -depleted VP to oxidize veratryl alcohol. These observations, in addition to a notorious redox potential decrease, suggest that Ca^{2+} -depleted versatile peroxidase is able to form the active intermediate compound I but its long range electron transfer has been disrupted.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Calcium depletion; Inactivation; Versatile peroxidase

1. Introduction

Peroxidases catalyze the oxidation of substrates using H_2O_2 as a final electron acceptor. All peroxidases share the same catalytic mechanism consisting of three steps. First, the ground state ferric peroxidase reacts with H_2O_2 to yield a two electron-oxidized intermediate known as the compound I. Then, compound I is reduced by an exogenous substrate in a one-electron reaction to another enzyme intermediate called compound II, which is subsequently reduced back to the

ground state by another substrate molecule also in an one-electron reaction [1].

Class II fungal peroxidases [2], such as lignin (LiP), manganese (MnP) and versatile (VP) peroxidases, are able to oxidize a wide range of substrates with high redox potential [3,4]. Despite their obvious biotechnological value, the application of peroxidases has been constrained by a low operational stability [5,6]. In addition to suicide inactivation suffered by all peroxidases [7,8], members of class II are also thermo-labile and pH sensitive [9,10]. Both in MnP and LiP, activity loss after thermal or alkaline treatment correlates with the release of the structural Ca^{2+} embedded in their structures [9,11,12]. These ions, referred to as the proximal and distal Ca^{2+} , act as structural stabilizers of the heme cavity [13–15]. In fact, they maintain the relative positions of proximal and distal

* Corresponding author. Tel.: +52 777 329 1655; fax: +52 777 317 2388.
E-mail address: vazqduh@bt.unam.mx (R. Vázquez-Duhalt).

histidines, which are involved in the modulation of the peroxidase redox potential and in the acid–base activation of H_2O_2 at the beginning of the catalytic reaction, respectively [13].

Studies on the mechanism of alkaline and thermal inactivation of class II peroxidases have shown a change of the heme iron electronic state concomitant with structural calcium release. In native form, heme- Fe^{3+} mainly shows 5-coordinated high-spin (HS) configuration that changes to 6-coordinated low-spin (LS) state after inactivation. These observations, plus the inability of inactivated MnP to form compound I, have supported the bishistidine model of inactivation. This model argues that after Ca^{2+} release distal histidine becomes more flexible inducing a 6-coordinated heme- Fe^{3+} . Iron hexacoordination avoids the acid–base heterolysis of H_2O_2 leading to peroxidase inactivation [10,16,17]. However, it has been reported that heme- Fe^{3+} 6-coordination is not a deadlock, since it is easily reversed by iron chelating molecules [18]. More importantly, bishistidine inactivation model was built by characterizing Ca^{2+} -depleted MnP or LiP under conditions (pH 7.5 or higher) at which class II hemeperoxidases are not active independently of their Ca^{2+} content [16,17]. Alternatively, an important role has been proposed for the proximal histidine in the inactivation of horseradish peroxidase (HRP) [18], where structural changes have been detected around proximal cavity that could explain the decreased catalytic activity [18,19].

Versatile peroxidase (VP) is a structural and functional hybrid of LiP and MnP, showing both Mn^{2+} -dependent and Mn^{2+} -independent activities [20]. It has been isolated from several white rot fungi such as *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta* [21,22]. In the present work, the spectroscopic and redox properties of the Ca^{2+} -depleted VP from *B. adusta* were studied at the catalytic pH in order to obtain further insight into the molecular causes of its inactivation.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Bovine serum albumin (BSA), hydrogen peroxide, succinic acid, citric acid, potassium hydrogen phthalate, veratryl alcohol, anthracene, 9-methylanthracene, 2-methylanthracene, pyrene and tris(hydroxymethyl)aminomethane were provided by Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Sodium phosphate, sodium chloride, potassium chloride, calcium chloride and EDTA were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ). Perchloric acid was from Fluka Chemie (Switzerland). HPLC-grade acetonitrile was obtained from Fisher Scientific (Fairlawn, NJ).

2.2. Enzyme purification

Versatile peroxidase ($M_r=36.6$ kDa, $pI=3.5$, GenBank accession no. DQ060037) was isolated from *B. adusta* UAMH 8258 and purified by following the method of Wang [22]. The purity of the final VP preparation ($R_2=3.4$) was confirmed by Coomassie stained 12% SDS-PAGE.

2.3. Activity assay

Mn^{2+} -independent activity, also referred as the ligninase activity, was measured spectrophotometrically as the formation of veratryl aldehyde at 310 nm ($\epsilon=9300$ M^{-1} cm^{-1}) in reactions containing 4 mM veratryl alcohol in 50 mM succinic acid buffer, pH 3 [23]. The assay was started by the addition of H_2O_2 to a final concentration of 1 mM. Manganese-dependent activity was estimated by the H_2O_2 -dependent formation of a Mn^{3+} -malonate complex at 270 nm ($\epsilon=11590$ M^{-1} cm^{-1}). Reactions contained 0.5 mM manganese sulfate in 50 mM malonate buffer (pH 4.5), and a final H_2O_2 concentration of 0.1 mM [24]. Protein concentration was determined by the Bradford method (Bio-Rad protein assay), using BSA as standard.

Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (anthracene, 2-methylanthracene, 9-methylanthracene and pyrene) was assayed in reaction mixtures containing 20 μM aromatic hydrocarbon, from 33 to 1400 nM VP and 10% (v/v) acetonitrile in 50 mM malonate buffer pH 4.5. Reactions were started by adding hydrogen peroxide to a final concentration of 1 mM and incubated during 10 min at room temperature. Enzyme activity was estimated as the decrease of aromatic compound measured by HPLC on a C_{18} reverse phase column (2.1 \times 100 mm) Hypersil ODS 5 μ (Agilent) isocratically eluted (0.5 mL/min) with 70:30 v/v acetonitrile–water mixture. Substrates were monitored at 235 nm for pyrene, 250 nm for anthracene and 2-methylanthracene, and at 255 nm for 9-methylanthracene.

2.4. Preparation and reconstitution of Ca^{2+} -depleted VP

Ca^{2+} -depleted peroxidase was prepared by incubating 12.94 μM VP in 12 mM Tris–HCl (pH 7.0) containing 9 mM EDTA until ligninase activity was not detected. Reconstitution was accomplished by dialyzing Ca^{2+} -depleted VP against 100 mM CaCl_2 in 20 mM Tris, pH 7.5 during 96 h at 4 $^\circ\text{C}$.

The Ca^{2+} content of VP was determined by atomic absorption. Native and Ca^{2+} -depleted VP were exhaustively dialyzed against milliQ grade water and digested with perchloric acid. The digested samples were diluted in a solution containing 25 mM KCl, as ionization inhibitor, and 0.35% perchloric acid. Finally, atomic absorption measurements were performed on a Varian SpectraAA 220.

2.5. Electronic absorption spectroscopy

Absorption spectra of enzyme preparations were obtained in a Beckman DU650 spectrophotometer at 25 $^\circ\text{C}$. The inactivated enzyme (Ca^{2+} -depleted) or native enzyme were dissolved in 50 mM citric acid, pH 4.5 and 50 mM Tris, pH 7.5 to a final concentration of 2.58 μM . The final pH of each solution was verified.

Soret band bleaching was monitored by UV-Vis spectrophotometry. After addition of 1 mM H_2O_2 to a Ca^{2+} -depleted VP preparation, spectra were acquired every 3 min. The inactivated enzyme (1.29 μM) was dissolved in 50 mM

Table 1
Dependence of VP catalytic activity on structural calcium ions

VP	Specific activity (%) ^a	Calcium content (Ca ²⁺ /VP molecule)
Native	100	2.31 (±0.14)
Ca-depleted ^b	no activity	0.22 (±0.01)
Reconstituted ^c	40.83 (±0.88)	ND ^d

^a Specific activity was measured by oxidation of veratryl alcohol and expressed as percentage of native VP.

^b Calcium depletion was performed by incubating VP in 10 mM Tris, 7.5 mM EDTA, pH 7.0 at 25 °C until complete inactivation.

^c For VP reconstitution, Ca²⁺-depleted VP was dialyzed against 20 mM Tris, 0.1 M CaCl₂, pH 7.5 during 96 h at 4 °C.

^d Not determined.

citric acid buffer solution (pH 4.5) or in a 50 mM Tris buffer (pH 7.5).

2.6. Redox potential

For redox potential measurements the concentration of native and Ca²⁺-depleted VP was 78.68 μM. In both cases, the protein samples were dissolved in 50 mM citric acid buffer, pH 4.5. The working electrode was a platinum disc. A stainless steel bar was used as auxiliary electrode, while the reference electrode was a silver–silver chloride electrode. Ferro-ferricyanide ($E=0.356$ V/NHE) was utilized as internal reference.

2.7. Electron paramagnetic resonance spectroscopy

CW-X-band (9 GHz) EPR spectra of native and Ca²⁺-depleted VP (0.14 mM) in 50 mM citric acid buffer at pH 4.5 and in 50 mM Tris buffer at pH 7.5 were obtained in a Bruker E500 Elexys Series using the Bruker ER 4122 SHQE cavity and an Oxford helium continuous flow cryostat (ESR900). Instrument settings are given in figure legends. The reaction of native and Ca²⁺-depleted VP with H₂O₂, performed in a molar ratio enzyme/H₂O₂ of 1:8, was quickly stopped by immersion in liquid nitrogen before spectrum acquisition.

3. Results

Purified VP from *B. adusta* UAMH 8258, $R_z=3.4$, was completely inactivated in the presence of EDTA (Table 1). As previously reported for MnP and LiP [9,11], activity loss correlates with a reduction in the calcium content of VP. This value diminishes from 2.31 ± 0.14 Ca²⁺ ions per native VP molecule to only 0.22 ± 0.01 Ca²⁺ ions per inactivated VP molecule (Table 1). Soret absorption band is preserved after EDTA treatment and Fe³⁺ remained coordinated to heme. The cause-consequence relationship between inactivation and Ca²⁺ loss was established by reconstituting the peroxidase activity in presence of CaCl₂. In our hands, the 40.83% of the original activity was recovered (Table 1), corroborating the direct dependence of catalytic activity on structural Ca²⁺ ions. Structural changes of some enzyme molecules during the Ca²⁺ extraction, protein washing and Ca²⁺ reincorporation may be the origin of the low activity recovery.

Activity pH profile was determined for both native and Ca²⁺-depleted enzymes (data not shown). In both cases, the optimal pH was 4.5 and the profiles were essentially similar with a slight shift to the acidic side in the pH profile of Ca²⁺-depleted VP.

Electronic absorption spectra for native and Ca²⁺-depleted VP at both pH 7.5 (neutral) and pH 4.5 (catalytically optimum), are shown in Fig. 1. In previous studies, structural changes around heme cavity after Ca²⁺ loss were performed at pH 7.5 or higher [16,17]. However, fungal class II peroxidases, VP included, have atypically low optimal pH and, independently of Ca²⁺ content, they do not show catalytic activity at neutral pH [22,25]. Thus, the characterization of VP under conditions where normally it shows low catalytic performance (i.e., neutral pH) could lead to misinterpretation. At pH 7.5, native VP spectrum has characteristic bands at 588 nm (α), 541 nm (β) and 406.8 nm (Soret). Two charge transfer bands are also observed at 644.4 nm (CT1) and 498 nm (CT2). At pH 4.5, where the enzyme shows maximal Mn²⁺-dependent activity [22], the spectrum of native protein is similar to that observed at pH 7.5, albeit CT1 band notoriously blue shifts to 635.2 nm,

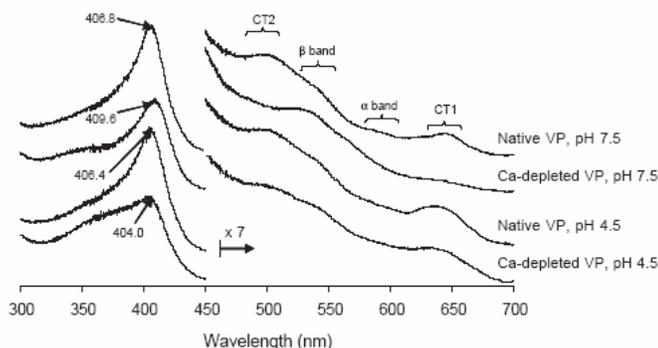


Fig. 1. Electronic absorption spectra of native and Ca²⁺-depleted VP at two different pH (50 mM Tris, pH 7.5 and 50 mM sodium citrate, pH 4.5). For Ca²⁺-depleted preparations, 12.94 μM VP from *B. adusta* was completely inactivated in 12 mM Tris, 9 mM EDTA, pH 7.0; prior to spectra acquisition, the inactivation mixture was five times diluted in the indicated buffer.

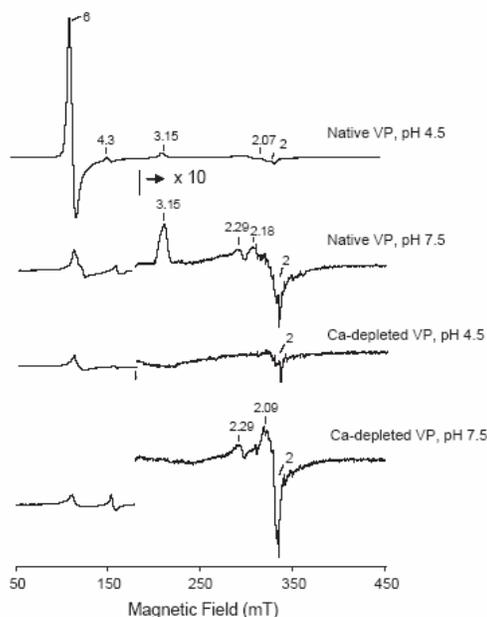


Fig. 2. Low temperature (20 K) EPR spectra of native and Ca^{2+} -depleted VP at two different pH (50 mM Tris, pH 7.5 and 50 mM sodium citrate, pH 4.5). The high field region has been amplified. All enzyme concentrations were 0.14 mM. Spectra were obtained at ν , 9.39 GHz; modulation amplitude, 1 mT; microwave power, 2 mW and modulation frequency, 100 kHz.

indicating a heme iron 6-coordinate HS state (being H_2O the 6th ligand) upon pH acidification [26,27].

On the other hand, the spectrum of Ca^{2+} -depleted VP at pH 7.5 shows a notorious attenuation of the Soret band respect to native VP and the complete disappearance of both charge transfer (CT1, CT2) bands. Concomitantly, α and β bands appears enhanced and blue shifted to 563 and 523 nm,

respectively. Furthermore, a new weak band is observed around 350 nm. The bands in the wavelength range 500–700 nm are very sensitive to structural changes around heme cavity, being CT1 band exclusive of HS peroxidases [27,28]. Vanishing of CT1 band in the spectrum of Ca^{2+} -depleted VP indicates the 6-coordinate LS configuration of heme- Fe^{3+} . From the characteristics of α and β bands can be inferred that a nitrogen atom, probably from distal histidine, acts as the sixth ligand [26,28]. Similar spectral features have been reported for MnP and LiP after inactivation treatments that involve the loss of structural Ca^{2+} ions. For these cases, bishistidine heme iron 6-coordination has been proposed as a barrier for acid–base heterolysis of H_2O_2 , which would lead to peroxidase inactivation [10,16,17]. However, the spectrum of Ca^{2+} -depleted VP at pH 4.5 is not consistent with that observed at pH 7.5. Although they are weaker than native bands, the spectrum conserves CT1 and CT2 bands with maximum wavelength at 637.8 and 498 nm, respectively. The presence of CT1 band in Ca^{2+} -depleted VP spectrum indicates a HS configuration for heme- Fe^{3+} that opposes to bishistidine 6-coordinated LS observed for Ca^{2+} -free peroxidases at neutral pH. Soret band of Ca^{2+} -depleted VP at pH 4.5, unlike spectrum at pH 7.5, blue shifts to 404 nm and the shoulder at 350 nm absorbs more strongly. In addition, this strong absorption band at ~ 350 nm is also indicative of 5-coordinated HS state for iron [28].

The electronic configurations of native and Ca^{2+} -depleted VP at pH 4.5 and pH 7.5 were also assessed by low temperature Electron Paramagnetic Resonance, EPR (Fig. 2). Native VP at pH 4.5 shows a typical peroxidase EPR spectrum with mainly HS signals ($g=6.00$ and $g=2.00$) mixed with a low percentage of LS species ($g=3.15$, 2.07) [29,30]. The signal at $g=4.3$ corresponds to a non-heme rhombic Fe impurity [31]. At pH 7.5, the spectrum of native VP shows a marked decrease of the HS Fe species with a concomitant increase of the percentage of the LS Fe species. On the other hand, the Ca^{2+} -depleted enzyme spectrum at pH 4.5 is characterized by the absence of LS species, in agreement with the UV-Vis spectrum, albeit the high-spin ferric species ($g_{\perp}=6.00$ and $g_{\parallel}=2.00$) also decrease. At pH

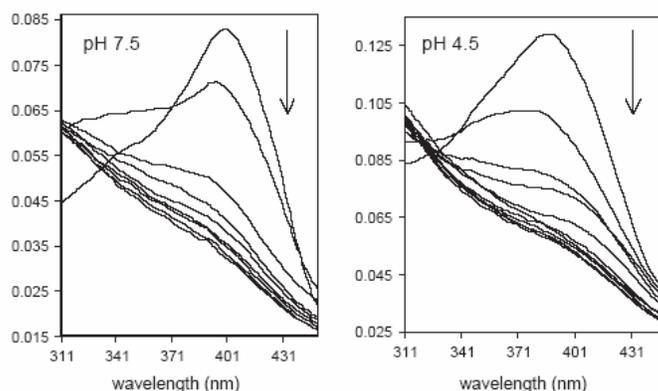


Fig. 3. Soret discoloration of 1.29 μM Ca^{2+} -depleted VP in the presence of 1 mM H_2O_2 at two different pH (50 mM Tris, pH 7.5 and 50 mM sodium citrate, pH 4.5). Spectra were obtained every 3 min at 25 $^{\circ}\text{C}$. The arrow indicates the direction of change.

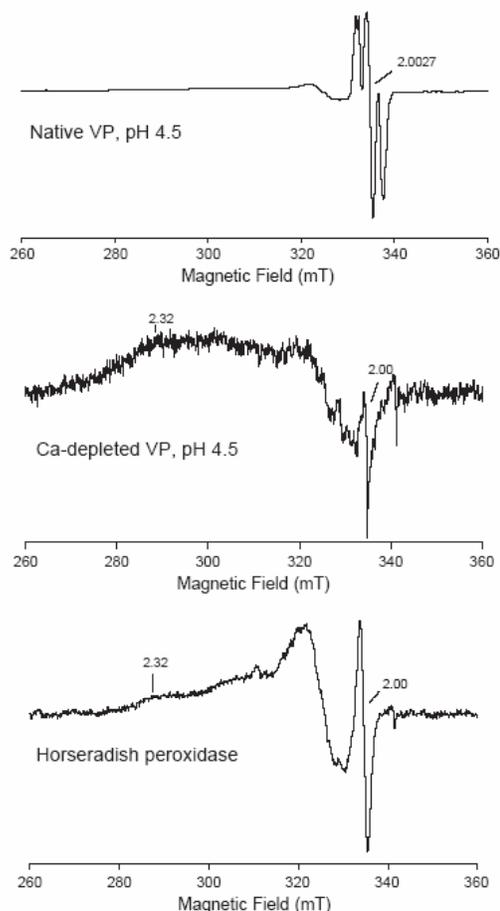


Fig. 4. Low temperature (20 K) EPR spectra of native VP (0.16 mM), Ca^{2+} -depleted VP (0.11 mM), and horseradish peroxidase (0.33 mM) after the addition of eight equivalents of H_2O_2 at pH 4.5. Instrument settings were: ν , 9.39 GHz; modulation amplitude, 0.2 mT; microwave power, 2 mW and modulation frequency, 100 kHz.

7.5, EPR spectrum of Ca^{2+} -depleted enzyme (Fig. 2) shows a decrease in the HS Fe species with a residual contribution of the LS Fe species, confirming the spectrophotometric measurements.

The thermal inactivation of LiP and MnP produces the loss of the distal Ca^{2+} , which may allow the movement of the α -helix containing distal His and its link to the iron forming a bishistidine arrangement [16,17]. As in our case, the EPR spectrum of a solution of Ca^{2+} -depleted MnP at pH 4.5 showed a decrease in the low-spin signal and a slight increase in the high-spin signal respect to that recorded at pH 7.5 [16]. It has been proposed that this pH-dependent transition at pH 4.5 is due to the protonation of distal His, which disrupts the direct link of distal His to the heme- Fe^{3+} and resulted in the formation of a

complex with water bridged between the heme- Fe^{3+} and distal His [16]. This behavior confirms our results obtained for Ca^{2+} -depleted VP at pH 4.5.

Soret band of Ca^{2+} -depleted VP was discolored in the presence of 1 mM H_2O_2 at both pH 7.5 and 4.5 (Fig. 3). Hemeperoxidases undergo autocatalytic oxidative inactivation in the presence of excess H_2O_2 and in the absence of a reducing substrate due to the formation of deleterious compound III [32]. This superoxo- Fe^{3+} porphyrin radical arises from the reaction of compound II with H_2O_2 [33]. The degradation of the heme prosthetic group is one of the molecular events occurring during this mechanism-based inactivation [7,8]. At pH 4.5, as expected for a HS penta-coordinated Fe, Ca^{2+} -depleted VP is able to react with the hydrogen peroxide molecule. On the other hand, the heme destruction of 6-coordinated LS state Ca^{2+} -depleted VP at pH 7.5 indicates that H_2O_2 is able to disrupt the interaction between the distal histidine and the heme- Fe^{3+} and reacts to form the deleterious species that produce oxidative inactivation, even if it is unable to react with an exogenous reducing substrate. On the basis of these observations, it is possible to deduce that VP inactivation does not rise from the impossibility to react with H_2O_2 , even in the case of a LS 6-coordinate electronic configuration, but from a mechanism directly related with the oxidation of exogenous substrates.

EPR measurements of the reaction of Ca^{2+} -depleted VP with hydrogen peroxide were performed for deeper analysis. Spectra were recorded after the addition of a small excess of hydrogen peroxide (1:8 enzyme: H_2O_2 molar ratio) in order to prime the catalytic cycle but to prevent the oxidative inactivation. Fig. 4 shows EPR radical spectra of native and Ca^{2+} -depleted VP and compared with these obtained from horseradish peroxidase. As previously reported [29], EPR radical spectrum of native VP at pH 4.5 and after the addition of 8 equivalents of H_2O_2 showed the formation of a tryptophan radical with a g_{iso} value of 2.0027. This radical has been shown to be essential for veratryl alcohol oxidation [34]. On the other hand, Ca^{2+} -depleted VP spectrum at pH 4.5 is significantly different to the native protein (Fig. 4), showing signals with $g_{\parallel}=2.3$ and $g_{\perp}\sim 2.00$ values. Similar radical signals have been obtained for the Ca^{2+} -depleted VP at pH 7.5 (data not shown). This spectrum is compared with these from native horseradish peroxidase obtained in the same experimental conditions (Fig. 4). The signals with $g_{\parallel}=2.3$ and $g_{\perp}\sim 2.00$ are perfectly overlapping. These results suggest that the radical species formed in Ca^{2+} -depleted VP seems to be a

Table 2
Specific activity of native and Ca^{2+} -depleted versatile peroxidase on different substrates

Substrate	Native VP (min^{-1})	Ca^{2+} -depleted VP (min^{-1})
Mn^{2+}	1142 (± 91)	53 (± 4)
Veratryl alcohol	251 (± 20)	No activity
ABTS ^a	178 (± 17)	13 (± 1)
DEPDA ^b	64497 (± 6 213)	3000 (± 554)
Guaiacol	237 (± 4)	18 (± 2)

^a 2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).

^b *N,N*-diethyl-1-phenylenediamine sulfate.

Table 3
Specific activity for native and Ca²⁺-depleted versatile peroxidase on polycyclic aromatic hydrocarbons with different ionization potentials

Substrate	Ionization potential (eV) ^a	Specific activity (min ⁻¹)	
		Native VP	Ca-depleted VP
9-Methylanthracene	7.23	296.86 (±15.91) ^b	0.58 (±0.05)
2-Methylanthracene	7.42	22.08 (±1.99)	NAD ^c
Anthracene	7.55	8.37 (±0.42)	NAD
Pyrene	7.72	3.85 (±0.57)	NAD

Reaction mixture contained 20 μM aromatic compound and 10% acetonitrile in 50 mM malonic acid buffer, pH 4.5.

^a Values obtained from Ref. [37].

^b Values in parentheses are standard deviations.

^c NAD, no activity detected.

porphyrin-based radical, as in Compound I, instead of Trp radical like was shown for the native enzyme [29,30].

Native and Ca²⁺-depleted VP were assayed on different substrates (Table 2). Ca²⁺-depleted VP is able to oxidize Mn²⁺ to Mn³⁺ and shows between 4.6% and 7.7% of the native activity with some organic substrates. However no veratryl alcohol oxidation was detected. In native VP, tryptophan radical formation is coupled to compound I and compound II reductions and W170 residue is essential for veratryl alcohol oxidation [34], while Mn²⁺ is oxidized at the heme edge. This intramolecular reaction is possible because tryptophan oxidation proclivity is combined with the high redox potential of heme catalytic intermediates. With the aim of verify whether the inability to oxidize superficial Trp in Ca²⁺-depleted VP arises from an oxidizing power decrease, redox potentials for the couple Fe³⁺/Fe²⁺ of native and Ca²⁺-depleted VP were determined. At pH 4.5 native VP has a redox potential of 390 mV, while Ca²⁺-depleted sample showed a lower value of 190 mV. On the other hand, the activity profile against different polycyclic aromatic hydrocarbons with a wide range of ionization potentials were determined for native and Ca²⁺-depleted VP (Table 3). In concordance with its low ionization potential, 9-methylanthracene was preferentially oxidized by native VP followed by 2-methylanthracene, anthracene and pyrene. On the other hand, Ca²⁺-depleted VP, with a lower redox potential and a reduced catalytic activity, only was able to oxidize the easiest oxidizing substrate, 9-methylanthracene. These data confirm the reaction of Ca²⁺-depleted VP with H₂O₂ and the activation of the catalytic cycle. Moreover, the reduction of the oxidizing power of Ca²⁺-depleted VP, indicated by the reduction of the redox potential and the constriction of the ionization potential range of substrates, could be the origin of the inability to form the tryptophan based radical, essential for veratryl alcohol oxidation, and in general, its inability to oxidize high ionization potential substrates.

4. Discussion

The catalytic activity of versatile peroxidase from *B. adusta*, as other peroxidases, depends on Ca²⁺ ions embedded into the enzyme (Table 1). Calcium release has been also observed during the thermal and alkaline inactivations of MnP and LiP,

while HRP partially loses its catalytic activity upon Ca²⁺ depletion [9–11,35]. Previous inactivation model proposed an increase in distal histidine flexibility after Ca²⁺ loss, leading a 6-coordinating heme-Fe³⁺ and to an activity inhibition [16,17]. In addition, Howes et al. [18] suggested, for Ca²⁺-depleted HRP, other structural changes around proximal histidine that could also influence the catalytic performance of the enzyme. Unfortunately, most analogous precedent studies were performed at neutral pH condition [16,17], while at pH 4.5 VP shows its maximum catalytic activity [22].

We have found significant differences in the iron spin state according the pH in both, native and Ca²⁺-depleted VP (Figs. 1 and 2). Electronic absorption spectra at pH 7.5 indicate a 6-coordinated LS electronic configuration for Ca²⁺-depleted VP, as supported by the vanishing of CT1 band as well as the shift and intensity enhancement of α and β bands respect to native VP (Fig. 1) [28]. Under these experimental conditions, equivalent spectral features were observed for thermally inactivated MnP and LiP, being interpreted to be the result of heme-Fe³⁺ bishistidine 6-coordination [16,17]. In such electronic state, heme-Fe³⁺ was believed unable to utilize H₂O₂ in order to form compound I. Nevertheless, Ca²⁺-depleted VP can react with H₂O₂ leading to compound III and Soret band discoloration (Fig. 3), the characteristic signal of the suicide inactivation of peroxidases [7,8], which contradicts the bishistidine-driven catalytic deadlock. In fact, the disruption of the distal Fe-histidine bond by heme-Fe³⁺ chelating compounds have been easily accomplished in HRP [18], indicating that the strength of distal histidine-Fe bond is not enough to avoid H₂O₂ activation.

However, the HS configuration of Ca²⁺-depleted VP at pH 4.5, indicated by the CT1 electronic absorption band at 637.8 nm (Fig. 1) and EPR signals at *g*=6.00 and *g*=2.00 (Fig. 2), confirms that VP inactivation is independent of bishistidine heme-Fe³⁺ hexa-coordination. The dependence of electronic absorption spectrum on the pH was also reported for Ca²⁺-depleted MnP [16]. It is reasonable to suppose that calcium depletion actually promotes a greater flexibility of heme cavity, including the distal histidine, and under specific pH conditions is able to 6-coordinate heme-Fe³⁺. However, as described before, distal Fe-imidazole bond may reduce, but not block, the VP catalytic activity.

Redox potential of hemeperoxidases is controlled by the relative position and the strength of the imidazolate character of proximal histidine, which are both modulated by a series of H-bonds to neighbour residues and by the proximal Ca²⁺ [13,36,37]. The redox potential for the pair Fe³⁺/Fe²⁺ of Ca²⁺-depleted VP is lower than the native enzyme, indicating structural changes in the proximal cavity that could increase the imidazolate character of proximal histidine by modifying its H-bonding pattern or, alternatively, by changing the bond distance between proximal histidine and heme-Fe³⁺. Although the couple Fe³⁺/Fe²⁺ is not involved in the catalytic reaction of peroxidases, redox potential changes with the same trend could be expected for the pairs compound I/compound II and compound II/ground state in the catalytic cycle [37]. Thus, the observed low activity of Ca²⁺-depleted VP could be related

with a reduced oxidizing power. In agreement, class I peroxidases, which do not contain structural calcium ions, show low redox potentials due to shorter proximal Fe-imidazole bond [13]. This effect has also been observed in Ca^{2+} -depleted horseradish peroxidase, where there are structural changes around proximal histidine and the concomitant change of the redox potential [18,19]. In support of this, the catalytic profile of VP after Ca^{2+} depletion shows a notorious reduction, being only able to oxidize substrates with low ionization potentials (Table 3). It is well known that the specific activity of lignin peroxidase [3,38], manganese peroxidase [39] and chloroperoxidase [40] is inversely proportional to the ionization potential of the substrate (polycyclic aromatic hydrocarbons). Because redox potential limits the range of substrates that peroxidases can oxidize, its reduction promotes a drop in the peroxidase catalytic capabilities.

Reaction of Ca^{2+} -depleted VP with H_2O_2 produces a radical that remains delocalized on the porphyrin ring, corresponding to compound I intermediate (Fig. 4). Contrasting, under the same conditions, native VP shows a solvent exposed tryptophan radical (Fig. 4), which has been assigned to the Trp170 [29]. During catalytic cycle, this solvent exposed residue is selectively oxidized by compound I and compound II in order that the peroxidase oxidizing power becomes accessible for substrates unable to reach the heme edge [13,34]. Nevertheless, the decrease of the oxidizing capability of VP after calcium depletion prevents the oxidation of W170. In this way, the lack of the tryptophanyl radical in Ca^{2+} -depleted VP abolishes the catalytic activity mediated by such radical.

So far we can conclude that the low activity of Ca^{2+} -depleted VP obeys to structural changes that alter their oxidizing capabilities. These changes seem to prevent the oxidation of substrates with high ionization potential and the oxidation of the superficial W170, which is essential for the veratryl alcohol oxidation. Even if is unable to react with some endogenous substrates, compound I intermediate of Ca^{2+} -depleted VP is able to support the self-oxidative heme destruction, as well as the oxidation of low-potential substrates. Thus, structural calcium ions have a relevant role in versatile peroxidase from *B. adusta*, which is reflected in the catalytic properties of the enzyme.

Acknowledgements

We thank Raunel Tinoco, Rosa Román and Pilar Fernández for technical support. We thank Stefania Giansanti for valuable contribution. J.V. holds a CONACYT (144892) and UNAM (DGEP) fellowships. This work was funded by the National Council for Science and Technology of Mexico.

References

- [1] H.B. Dunford, Heme Peroxidases, VHC-Wiley, New York, 1999.
- [2] K.G. Welinder, Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2 (1992) 388–393.
- [3] R. Vazquez-Duhalt, D.W.S. Westlake, P. Fedorak, Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 459–466.
- [4] D. Wesenberg, I. Kyriakides, S.N. Agathos, White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents, *Biotechnol. Adv.* 22 (2003) 161–187.
- [5] S. Colonna, N. Gaggero, C. Richelmi, P. Pasta, Recent biotechnological developments in the use of peroxidases, *TIBTECH* 17 (1999) 163–168.
- [6] F. van de Velde, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis, *Trends Biotech.* 19 (2001) 73–80.
- [7] H. Jenzer, W. Jones, H. Kohler, On the molecular mechanism of lactoperoxidase-catalyzed H_2O_2 metabolism and irreversible enzyme inactivation, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 15550–15556.
- [8] B. Valderrama, M. Ayala, R. Vazquez-Duhalt, Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes, *Chem. Biol.* 9 (2002) 555–565.
- [9] G.R.J. Sutherland, S.D. Aust, The effects of calcium on the thermal stability and activity of manganese peroxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* 332 (1996) 128–134.
- [10] P. George, M. Kvaratskhelia, M.J. Dilworth, R.N.F. Thorneley, Reversible alkaline inactivation of lignin peroxidase involves the release of both the distal and proximal site calcium ions and bishistidine co-ordination of the haem, *Biochem. J.* 344 (1999) 237–244.
- [11] G. Nie, S.D. Aust, Effect of calcium on the reversible thermal inactivation of lignin peroxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* 337 (1997) 225–231.
- [12] S.L. Timofeevski, S.D. Aust, Kinetics of calcium release from manganese peroxidase during thermal inactivation, *Arch. Biochem. Biophys.* 342 (1997) 169–175.
- [13] T. Choinowski, W. Blodig, K.H. Winterhalter, K. Piontek, The crystal structure of lignin peroxidase at 1.7 Å resolution reveals a hydroxy group on the C-Beta of tryptophan 171: a novel radical site formed during the redox cycle, *J. Mol. Biol.* 286 (1999) 809–827.
- [14] M. Sundaramoorthy, K. Kishi, M.H. Gold, T.L. Poulos, The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06 Å resolution, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 32759–32767.
- [15] M. Gajhede, D.J. Schuller, A. Henriksen, A.T. Smith, T.L. Poulos, Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution, *Nat. Struct. Biol.* 4 (1997) 1032–1038.
- [16] G.R.J. Sutherland, L. Schick Zapanta, M. Tien, S.D. Aust, Role of calcium in maintaining the heme environment of manganese peroxidase, *Biochemistry* 36 (1997) 3654–3662.
- [17] G. Nie, S.D. Aust, Spectral changes of lignin peroxidase during reversible inactivation, *Biochemistry* 36 (1997) 5113–5119.
- [18] B.D. Howes, A. Feis, L. Raimondi, C. Indiani, G. Smulevich, The critical role of the proximal calcium ion in the structural properties of horseradish peroxidase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 40704–40711.
- [19] Y. Shiro, M. Kurono, I. Morishima, Presence of endogenous calcium ion and its functional and structural regulation in horseradish peroxidase, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 9382–9390.
- [20] A.T. Martínez, Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases, *Enzyme Microbiol. Technol.* 30 (2002) 425–444.
- [21] F.J. Ruiz-Dueñas, S. Camarero, M. Pérez-Boada, M.J. Martínez, A.T. Martínez, A new versatile peroxidase from *Pleurotus*, *Biochem. Soc. Trans.* 29 (2001) 116–122.
- [22] Y. Wang, R. Vazquez-Duhalt, M.A. Pickard, Purification, characterization, and chemical modification of manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* UAMH 8258, *Curr. Microbiol.* 45 (2002) 77–87.
- [23] M. Tien, T.K. Kirk, Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, *Methods Enzymol.* 161 (1988) 238–248.
- [24] H. Wariishi, H.B. Dunford, I.D. MacDonald, M.H. Gold, Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 3335–3340.
- [25] M. Tien, T.K. Kirk, C. Bull, J.A. Fee, Steady-state and transient-state kinetic studies on the oxidation of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by the ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* Burds, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 1687–1693.
- [26] G. Smulevich, M.A. Miller, J. Kraut, T.G. Spiro, Conformational change and histidine control of heme chemistry in cytochrome c peroxidase:

ARTICLE IN PRESS

170

J. Verdín et al. / Biophysical Chemistry 121 (2006) 163–170

- resonance Raman evidence from Leu-52 and Gly-181 mutants of cytochrome c peroxidase, *Biochemistry* 30 (1991) 9546–9558.
- [27] G. Smulevich, F. Neri, M.P. Marzocchi, K.G. Welinder, Versatility of heme coordination demonstrated in a fungal peroxidase. Absorption and resonance Raman studies of *Coprinus cinereus* peroxidase and the Asp245: Asn mutant at various pH values, *Biochemistry* 35 (1996) 10576–10585.
- [28] G. Smulevich, Understanding heme cavity structure of peroxidases: comparison of electronic absorption and resonance Raman spectra with crystallographic results, *Biospectroscopy* 4 (1998) S3–S17.
- [29] R. Pogni, M.C. Baratto, S. Giansanti, C. Teutloff, J. Verdín, B. Valderrama, F. Lenzian, W. Lubitz, R. Vazquez-Duhalt, R. Basosi, Tryptophan-based radical in the catalytic mechanism of versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*, *Biochemistry* 44 (2005) 4267–4274.
- [30] A. Ivancich, G. Mazza, A. Desbois, Comparative electron paramagnetic resonance study of radical intermediates in turnip peroxidase isozymes, *Biochemistry* 40 (2001) 6860–6866.
- [31] W.E. Blumberg, J. Peisach, A. Wittenberg, J.B. Wittenberg, The electronic structure of protoheme peroxidases: I. An electron paramagnetic resonance and optical study of horseradish peroxidase and its derivatives, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 1854–1862.
- [32] M.B. Amao, M. Acosta, J.A. del Rio, R. Varon, F. Garcia-Canovas, A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide, *Biochim. Biophys. Acta* 1041 (1990) 43–47.
- [33] H. Wariishi, M.H. Gold, Lignin peroxidase compound: III. Mechanism of formation and decomposition, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 2070–2077.
- [34] M. Pérez-Boada, F.J. Ruiz-Dueñas, R. Pogni, R. Basosi, T. Choinowski, M.J. Martínez, K. Piontek, A.T. Martínez, Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways, *J. Mol. Biol.* 354 (2005) 385–402.
- [35] R.H. Haschke, J.M. Friedhoff, Calcium-related properties of horseradish peroxidase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80 (1978) 1039–1042.
- [36] L. Banci, I. Bertini, P. Turano, M. Tien, T.K. Kirk, Proton NMR investigation into the basis for the relatively high redox potential of lignin peroxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 6956–6960.
- [37] C.D. Millis, D. Cai, M.T. Stankovich, M. Tien, Oxidation-reduction potentials and ionization states of extracellular peroxidases from the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Biochemistry* 28 (1989) 8484–8489.
- [38] K.E. Hammel, B. Kalyanaraman, T.K. Kirk, Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo(p)dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 16948–16952.
- [39] B.W. Bogan, R.T. Lamar, K.E. Hammel, Fluorene oxidation in vivo by *Phanerochaete chrysosporium* and in vitro during manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 1788–1792.
- [40] R. Vazquez-Duhalt, M. Ayala, F.J. Marquez-Rocha, Biocatalytic chlorination of aromatic hydrocarbons by chloroperoxidase of *Caldariomyces fumago*, *Phytochemistry* 58 (2001) 929–933.