



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

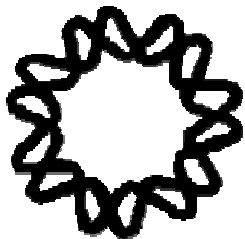
MODULACIÓN DEL POTENCIAL REDOX EN
CITOCROMO C Y SU EFECTO EN LA
OXIDACIÓN DE FENOLES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
I.BQ. ALEXIS JOAVANY RODRÍGUEZ SOLÍS

TUTOR: DR. RAFAEL VÁZQUEZ DUHALT



CUERNAVACA, MORELOS.

2007



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.

El presente trabajo se realizó en el **Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología-UNAM**, bajo la asesoría del **Dr. Rafael Vázquez Duhalt**.

La realización de este proyecto de investigación fue posible gracias al apoyo económico de la SEMARNAT-2004 (COI-42).

Con todo mi amor y admiración, para Liz, gracias por tu amor, compañía y apoyo durante la realización de este proyecto en mi vida.

Con todo mi amor y respeto, para mis padres y hermano, gracias por su apoyo en cada etapa de mi vida y por el cariño incondicional que siempre me han brindado.

Agradecimientos

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por su incondicional apoyo y orientación durante el desarrollo de este proyecto, por cada una de sus valiosas enseñanzas y por dejarme pertenecer a su grupo de trabajo.

A los miembros del comité tutorial, Dra. Sylvie Le Borgne Le Gall, Dr. Edmundo Castillo Rosales y Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por sus importantes y entusiastas aportaciones en la realización de este proyecto y por contribuir a mi formación como maestro en ciencias.

A los miembros del jurado, Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera, Dr. Enrique Rudiño Piñera, Dr. Eduardo Torres Ramírez y Dr. Alfredo Martínez Jiménez. Su minuciosa revisión y crítica contribuyeron a hacer de éste un mejor trabajo.

Al M. B. Raunel Tinoco Valencia y a la Biol. Rosa Román Miranda, por su valioso apoyo técnico, paciencia y sobre todo por su indudable amistad durante mi estancia en el laboratorio.

A los *recalcitrantes*, Raunel, Rosa, Adriana, Jorge, Juan, Adriaan, Sergio, Liz, Cristina, Marcela, Dayanira, Lucia, Julio, Elizabeth y Lorena. Gracias por su amistad y apoyo.

A todos mis compañeros y amigos por su amistad y por los momentos de estudio y diversión.

A la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (COI-42), por el financiamiento para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (199738) por la beca otorgada para la realización de los estudios de Maestría en Ciencias Bioquímicas.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
RESUMEN	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Problemática ambiental	3
2.2. Xenobióticos	3
2.2.1. Hidrocarburos poliaromáticos(HPAs)	4
2.2.2. Fenoles y sus derivados	4
2.2.3. Pesticidas	5
2.3. Eliminación biológica de xenobióticos	7
2.3.1. Uso de enzimas en la biodegradación de xenobióticos	8
2.4. Hemoproteínas	9
2.4.1. Citocromo c	9
2.4.1.1. Actividad biocatalítica del citocromo c	10
2.4.1.2. Citocromo c, una proteína robusta	12
2.4.1.3. Modificación química del citocromo c	14
2.4.1.4. Ingeniería genética del citocromo c	16
2.5. Potencial redox y capacidad catalítica de las hemoproteínas	18
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS	22
4.1. Objetivo general	22
4.2. Objetivos particulares	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1. Reactivos y solventes	23
5.2. Modificación química del citocromo c	23
5.3. Mutantes de <i>cyc1</i> de <i>S. cerevisiae</i> , expresión heteróloga en <i>E. coli</i> y purificación	24
5.4. Determinación de la concentración de proteína	26
5.5. Ensayos de actividad de diferentes variantes de citocromo c en la oxidación de guayacol	26
5.6. Ensayos de oxidación de compuestos fenólicos	26
5.7. Estimación del potencial redox de los diferentes citocromos c	27

5.8. Generación y análisis de modelos estructurales de las variantes de citocromo c de <i>S. cerevisiae</i>	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1. Modificación química del citocromo c de <i>S. cerevisiae</i>	32
6.1.1. Efecto de las modificaciones químicas en la oxidación de guayacol	34
6.1.2. Efecto de las modificaciones químicas en la oxidación de fenoles	35
6.1.3. Estimación del potencial redox de la preparación PEG-Cyt-MET	37
6.2. Análisis de variantes de citocromo c de <i>S. cerevisiae</i>	42
6.2.1. Selección de variantes con actividades mejoradas	43
6.2.2. Actividad de la variante M2, para la oxidación de compuestos fenólicos	46
6.2.3. Estimación del potencial redox de la variante M2	48
6.3. Análisis de modelos estructurales de los citocromos c nativo y M2	50
7. CONCLUSIONES	63
8. PERSPECTIVAS	65
9. BIBLIOGRAFÍA	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Persistencia de algunos xenobióticos en el medio ambiente.....	6
Tabla 2. Principales biotransformaciones catalizadas por el citocromo c.....	10
Tabla 3. Sustratos y productos de las reacciones biocatalíticas del citocromo c.....	12
Tabla 4. Oxidación de hidrocarburos poliaromáticos por los citocromos c nativo y PEG-Cyt-MET ...	14
Tabla 5. Constantes cinéticas de citocromos c nativo y variantes en la oxidación de cloruro de pinacianol y pireno	17
Tabla 6. Potenciales redox de diferentes peroxidases.....	21
Tabla 7. Diferentes variantes de citocromo c estudiadas en este trabajo	24
Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos fenólicos ensayados	27
Tabla 9. Actividad específica de los citocromos c nativo y PEG-Cyt-MET en la oxidación de guayacol	34
Tabla 10. Actividad específica de los citocromos c nativo y PEG-Cyt-MET en la oxidación de fenoles <i>p</i> -sustituídos	35
Tabla 11. Potenciales redox de diferentes peroxidases medidos por voltametría y estimados por el enfoque basado en la teoría de Marcus y Sutin (1985)	40
Tabla 12. Actividades específicas de las diferentes variantes de citocromo c en la oxidación de guayacol	43
Tabla 13. Actividades específicas de los citocromo c, nativo, PEG-Cyt-MET y M2 en la oxidación de compuestos fenólicos	46
Tabla 14. Volumen interno de los diferentes modelos estructurales estimados con CASTp	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras químicas de hidrocarburos poliaromáticos	4
Figura 2. Estructuras químicas de compuestos fenólicos	5
Figura 3. Estructuras químicas de pesticidas.....	6
Figura 4. Efecto del pH en la oxidación biocatalítica de dibenzotiofeno por citocromo c en presencia de 1 mM de peróxido de hidrógeno.....	13
Figura 5. Efecto de la temperatura en la oxidación biocatalítica de cloruro de pinacianol por los citocromos c nativo y modificado con polietilenglicol	13
Figura 6. Termoestabilidad de los citocromos c nativo y modificado con polietilenglicol.....	16
Figura 7. Estabilidad del citocromo c de <i>S. cerevisiae</i> B102, variante estable al peróxido de hidrógeno ..	18
Figura 8. Ciclo catalítico del citocromo c en presencia de peróxido de hidrógeno y un sustrato aromático (AH)	19
Figura 9. Correlación semilogarítmica entre la velocidad de transferencia de electrones (k_{ET}) y el potencial redox de los sustratos ensayados (E°_s)	28
Figura 10. Espectro de absorbancia de 300-500 nm de los citocromos c de <i>S. cerevisiae</i> nativo y PEG-Cyt-MET (a). Desplazamiento de la banda Soret a 410 nm (b)	33
Figura 11. Diferencia entre los espectros de absorbancia de los citocromos c de <i>S. cerevisiae</i> nativo y PEG-Cyt-MET.....	33
Figura 12. Perfiles de actividad de los citocromos c nativo y PEG-Cyt-MET en la oxidación de compuestos fenólicos.....	36
Figura 13. Efecto del potencial redox de los sustratos sobre la actividad de los citocromos c nativo y PEG-Cyt-MET	37
Figura 14. Correlación entre el potencial redox de los sustratos y el logaritmo natural de la velocidad de transferencia de electrones determinada para el citocromo c nativo	38
Figura 15. Correlación entre el potencial redox de los sustratos y el logaritmo natural de la velocidad de transferencia de electrones determinada para PEG-Cyt-MET	39
Figura 16. Correlación entre E° de la pareja Fe^{II}/Fe^{III} determinado por voltametría y los valores de E° estimados con base en la actividad con compuestos fenólicos	40
Figura 17. Posiciones e interacciones de los diferentes aminoácidos cercanos al grupo hemoprostético en citocromo c de <i>S. cerevisiae</i>	42
Figura 18. Actividades específicas de las diferentes variantes de citocromo c en la oxidación de guayacol	44

Figura 19. Actividades específicas de los diferentes citocromos c en la oxidación de fenoles	47
Figura 20. Estructuras de los compuestos 4-hidroxiacetofenona y 4-nitrofenol	48
Figura 21. Correlación entre el E° de los sustratos y el logaritmo natural de la velocidad de transferencia de electrones determinada para el citocromo c variante M2	49
Figura 22. Empalme estructural entre el modelo del archivo de PDB 1YCC y el modelo obtenido para la proteína nativa	51
Figura 23. Empalme estructural de los citocromos c nativo y M2	52
Figura 24. Estructura del iso-1-citocromo c resuelto por RMN (Banci <i>et al.</i> , 1997)	53
Figura 25. Efecto de la mutación N52I en el citocromo c	54
Figura 26. Posición del residuo tirosina 67 en la cavidad del grupo hemoprostético	55
Figura 27. Posición de los residuos fenilalanina 67 y alanina 80 presentes en la variante M2	56
Figura 28. Cavidad del grupo hemoprostético del citocromo c de <i>S. cerevisiae</i> , mostrando la metionina 80, sexta coordinación del átomo de fierro	57
Figura 29. Cavidad del grupo hemoprostético mostrando la disrupción de la sexta coordinación como efecto de la mutación puntual M80A	57
Figura 30. Empalme estructural entre el citocromo c nativo y la variante M2	58
Figura 31. Espacio dentro de la cavidad del grupo hemoprostético en el citocromo c de <i>S. cerevisiae</i>	59
Figura 32. Acceso a la cavidad hemoprostética en los citocromos c	60
Figura 33. Volumen interno en la cavidad hemoprostética	60
Figura 34. Efecto del volumen interno de las diferentes variantes sobre la actividad peroxidasa del citocromo c de <i>S. cerevisiae</i> contra guayacol	61

Nomenclatura

Símbolo	Definición
^{18}O	Isótopo de oxígeno de 18 electrones
λ	Energía de reorganización
ABTS	Ácido 2,2-azino-bis(etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AFS	Amortiguador de fosfatos
Å	Amstrongs
ap	Aparente
ΔE	Fuerza conductora de electrones
DDT	1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano
ϵ	Coefficiente de extinción molar
E°	Potencial redox
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
F	Constante de Faraday
g	Fuerza de gravedad
GuHCl	Hidrocloreuro de guanidina
HPAs	Hidrocarburos poliaromáticos
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
k_0	Energía de activación del complejo enzima-sustrato
K_{cat}	Velocidad de reacción/mol de proteína
k_{ET}	Velocidad de transferencia de electrones
K_{M}	Constante de afinidad de la enzima por el sustrato
LB	Medio rico Luria-Bertani
MCPA	Ácido 2-metil-4,6-dicloro fenoxiacético
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
R	Constante general de los gases
REP	Resonancia electroparamagnética
RN	Reacción no reportada
r.p.m.	Revoluciones por minuto
R_z	Coefficiente de Reinheitszahl
T	Temperatura absoluta
v.v.m	Volumen de aire/volumen de caldo*minuto

RESUMEN

El desarrollo industrial y tecnológico conlleva la generación y liberación de diferentes compuestos químicos contaminantes, los cuales presentan diferentes efectos en el medio ambiente. Un ejemplo claro de este problema son los compuestos fenólicos, los cuales son los principales contaminantes en efluentes de refinerías, petroquímicas e industrias de manufactura de plaguicidas. Los fenoles son altamente tóxicos, carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos, y por ley la concentración de estos compuestos en efluentes industriales debe ser menor a 0.5 mg/L. La remoción de los fenoles de los efluentes industriales se puede realizar mediante procesos físicos y químicos, sin embargo estos procesos son económicamente factibles sólo cuando se trata de aguas residuales con concentraciones superiores a 500 mg/L. Una alternativa potencial para solucionar esta problemática es el uso de enzimas oxido-reductasas como las peroxidasas, que por sus capacidades oxidativas y baja especificidad pueden actuar sobre diferentes tipos de sustratos como hidrocarburos polinucleoaromáticos, pesticidas, colorantes industriales y fenoles.

La actividad de las peroxidasas está estrechamente relacionada con su potencial redox, por lo que entre mayor es el potencial redox de estas enzimas mayor es su capacidad oxidativa. Debido a esto, el estudio de estrategias que permitan aumentar el potencial de oxido-reducción de este tipo de enzimas es de gran interés.

Con base en lo anterior, se planteó como objetivo de este trabajo evaluar estrategias como la modificación química de proteínas y la mutagénesis sitio-dirigida, con la finalidad de modular el potencial redox del citocromo c de *Saccharomyces cerevisiae* (proteína con actividad peroxidasa *in vitro*), y así mejorar su actividad en la oxidación de compuestos fenólicos. Para este fin, se ensayaron preparaciones de citocromo c químicamente modificado con polietilenglicol en los grupos amino libres y metilado en los carboxilos libres, incluidos los propionatos del hemo, así como diferentes variantes genéticas de citocromo c de *S. cerevisiae*. Estas variantes fueron obtenidas por mutagénesis sitio-dirigida aplicada a residuos elegidos en función de su capacidad donadora de electrones, su interacción con el grupo hemoprostético y su posición respecto al acceso a la cavidad del grupo hemo.

Como resultado de este trabajo de investigación, se encontró que la modificación química con polietilenglicol y grupos metilo generó un aumento de 10 veces en la capacidad oxidativa del citocromo c hacia guayacol (2-metoxifenol). Sin embargo, la actividad en la oxidación de otros compuestos fenólicos no presentó cambios relevantes. El resultado más interesante es que se logró modular el potencial redox del citocromo c mediante la modificación química, aumentando en 194 mV el potencial redox de la preparación química, con respecto a la proteína sin modificar.

De las 8 variantes genéticas ensayadas, 7 presentaron mayor actividad en la oxidación de guayacol, compuesto usado para la selección inicial. Dentro de estas variantes genéticas, la variante M2, con 5 mutaciones puntuales T-5A/N52I/Y67F/M80A/C102T, presentó 75 veces mayor actividad en los ensayos con guayacol, por lo que fue seleccionada para ensayos con una batería de 11 diferentes compuestos fenólicos, presentando una actividad promedio 3.23 veces mayor a la de la proteína nativa con estos compuestos. Este aumento en la actividad puede estar relacionado con efectos geométricos dentro de la cavidad hemoprostética ocasionados por las mutaciones puntuales presentes en esta variante. El cambio del residuo metionina en la posición 80 por alanina elimina la sexta coordinación del átomo de hierro del grupo hemo, quedando con cinco coordinaciones, semejante al presente en las peroxidases. Como efecto de este cambio, la interacción del H₂O₂ con la molécula de hierro del hemo pudo haber sido facilitada, generando un aumento en la velocidad de oxidación.

En conclusión, la modificación química permitió aumentar el potencial redox del citocromo c. Sin embargo, como se demostró en este trabajo, la combinación de factores como la eliminación de la sexta coordinación del grupo hemo y efectos geométricos en citocromo c, también son importantes para incrementar la velocidad de oxidación de los compuestos fenólicos estudiados en este trabajo.

1. INTRODUCCIÓN

La actividad industrial y el desarrollo tecnológico generan necesariamente residuos contaminantes. La contaminación ambiental relacionada a estos puede trazarse en la historia desde el comienzo de las sociedades urbanas e industriales. Los problemas actuales de contaminación ambiental por especies químicas tienen su origen mayoritario en el desarrollo a gran escala de la química de síntesis desde comienzos del siglo XX. Las explotaciones mineras y metalúrgicas, la extracción y combustión de enormes cantidades de combustibles fósiles, la utilización masiva de polímeros sintéticos y las prácticas de agricultura intensiva, liberan al medio ambiente grandes cantidades de compuestos contaminantes, dentro de los cuales se puede destacar compuestos como pesticidas, herbicidas e hidrocarburos poliaromáticos.

Muchos de los compuestos xenobióticos habituales en operaciones industriales, actividades urbanas y en explotaciones agrícolas son persistentes en el medio ambiente, lo que provoca graves problemas de contaminación. Dentro de las principales razones de su persistencia ambiental se encuentran la presencia de sustituyentes extraños, tales como los halógenos; la aparición de enlaces inusuales como los *azo*, presentes en algunos colorantes industriales; la presencia de anillos aromáticos condensados; los excesivos tamaños moleculares; su hidrofobicidad; la carencia de permeasas específicas para estos compuestos en los microorganismos y su toxicidad.

La etapa limitante de la biodegradación o desintoxicación de la mayoría de los compuestos tóxicos en el medio ambiente se relaciona con su baja biodisponibilidad, la poca eficiencia de las rutas catabólicas para su metabolismo y la de los procesos microbianos de mineralización. La aparición reciente de nuevos compuestos o el cambio a formas bioactivas de los ya existentes, plantea un problema para su integración en los grandes ciclos naturales de regeneración de los elementos orgánicos, los cuales son mediados por microorganismos de distinto tipo. Como resultado, desde hace algunas décadas se ha generado un gran interés en el estudio de los efectos tóxicos ocasionados por estos compuestos en el medio ambiente, generando fuertes regulaciones industriales con el objetivo de desarrollar programas destinados al cuidado ambiental.

El uso de la biotecnología ha demostrado ser una alternativa para remediar muchos problemas de contaminación ocasionados por el desarrollo industrial. Aunque en muchos casos existe el potencial genético y enzimático para que mediante una presión selectiva prolongada se generen rutas con nuevas especificidades catabólicas, éstas pueden no aparecer lo suficientemente rápido o no ser lo suficientemente eficaces. Por lo anterior, herramientas como la modificación química, la genética molecular y la tecnología del ADN recombinante abren la posibilidad de acelerar el proceso de evolución en el laboratorio, integrando diferentes actividades catalíticas de interés medioambiental en un sólo microorganismo, o bien, creando actividades mejoradas o completamente nuevas, que permitan la mineralización de estos compuestos o su transformación en otros menos tóxicos, abordando así, de forma racional, la disminución y tratamiento de los residuos urbanos e industriales.

El uso de enzimas en procesos de descontaminación en ecosistemas altamente impactados con contaminantes, se presenta como una alternativa que en los últimos años ha tomado gran importancia. Existen muchos grupos de investigación a nivel mundial dedicados al estudio de las capacidades catalíticas de diferentes enzimas sobre compuestos contaminantes, así como al mejoramiento de su estabilidad y rango de sustratos. Por lo que en este trabajo se estudió el mejoramiento de las propiedades catalíticas del citocromo c en la oxidación de fenoles, por medio de la manipulación genética y química de esta proteína, evaluando el efecto de estos cambios en su potencial de oxido-reducción y la conformación geométrica de su cavidad hemoprostética. Se evaluaron diferentes variantes y preparaciones obtenidas por medio de mutaciones sitio-dirigidas y modificación química, dado que un incremento en el potencial redox de esta proteína o la presencia de una organización geométrica que favorezca su interacción con los sustratos puede permitir la biotransformación de un mayor número de compuestos xenobióticos y con una velocidad de reacción más alta.

2. ANTECEDENTES

2.1. Problemática ambiental

La industrialización de la agricultura, el rápido crecimiento de la industria química y la necesidad de generar energía a bajo costo, ha causado la aparición continua de nuevas sustancias químicas en la biosfera (Gianfreda y Bollag, 2002). Cerca de 100,000 compuestos químicos diferentes se producen comercialmente, sin el conocimiento de sus efectos sobre el medio ambiente y la salud humana. Los compuestos químicos más peligrosos son los pesticidas policlorados como el DDT, aldrín y dieldrín, debido a que pueden bioacumularse en la cadena alimenticia. Sin embargo, otros contaminantes químicos como los hidrocarburos poliaromáticos (HPAs), compuestos halogenados y fenoles (Gianfreda y Bollag, 2002; Gianfreda y Rao, 2004; Parales y Haddock, 2004), son conocidos mundialmente como contaminantes ambientales. Los principales blancos para la contaminación ocasionada por estos compuestos son el agua y el suelo, por lo que representan una importante preocupación para la salud humana y ambiental (Gianfreda y Bollag, 2002).

2.2. Xenobióticos

La palabra xenobiótico significa "ajeno a la vida", este término es aplicado a una gran variedad de compuestos químicos sintéticos, los cuales no se encuentran en la naturaleza de forma natural. Estos compuestos pueden contener elementos estructurales que son desconocidos o poco comunes en la naturaleza. En algunos reportes se ha utilizado el término "xenobióticos por concentración", el cual se refiere a concentraciones inusuales de compuestos que se encuentran normalmente en la naturaleza en cantidades pequeñas, como se observa en el caso de los hidrocarburos en derrames petroleros y los fenoles en algunos efluentes industriales.

2.2.1. Hidrocarburos poliaromáticos (HAPs)

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos se encuentran principalmente como componentes del petróleo, carbón y aceites. Son principalmente generados como productos de la combustión incompleta del material orgánico. Los HPAs migran a los sedimentos de ecosistemas acuáticos debido a su hidrofobicidad, ocasionando un incremento en su concentración. La importancia de la contaminación de estos compuestos radica en su actividad carcinogénica y mutagénica (Internacional Agency for Research on Cancer, 1983). En la figura 1 se observa la estructura de algunos HPAs de interés ambiental.

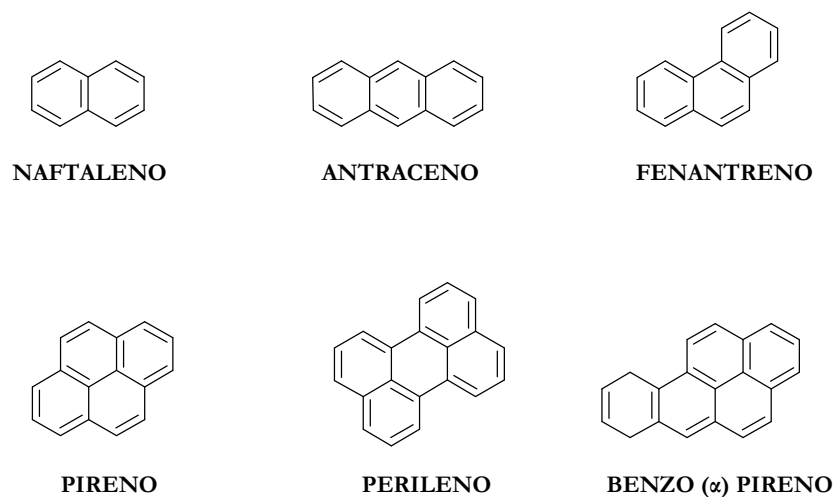


Figura 1. Estructuras químicas de hidrocarburos poliaromáticos.

2.2.2. Fenoles y sus derivados

Los fenoles son el principal constituyente encontrado en los efluentes de los procesos de conversión de carbón, hornos de coque, refineries de petróleo, manufactura de resinas fenólicas, fibra de vidrio, herbicidas y petroquímicos (Beszedits y Silbert, 1990). Los fenoles son tóxicos, carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos (Autenrieth *et al.*, 1991). Los fenoles inhiben el crecimiento microbiano en procesos de tratamiento biológicos, por lo que se encuentran entre los principales contaminantes ambientales (Chang *et al.*, 1995; Tay *et al.*, 2001).

Existe una gran variedad de derivados fenólicos. Dentro de los más importantes, desde el punto de vista ambiental, encontramos al 2-monoclorofenol, 4-monoclorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,6-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, tetraclorofenoles, pentaclorofenoles, cresoles y naftoles. Debido a la diversidad de estos compuestos, sus efectos sobre los organismos vivos varían según la especie. De manera general los fenoles son sustancias con toxicidad elevada. En la figura 2 se muestran algunos ejemplos de compuestos fenólicos.

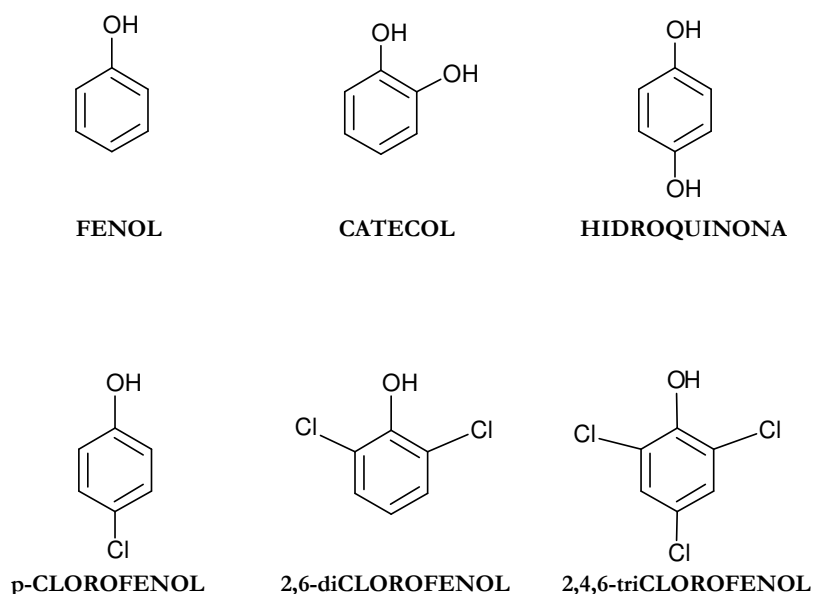


Figura 2. Estructuras químicas de compuestos fenólicos.

2.2.3. Pesticidas

El uso de pesticidas causa grandes problemas de contaminación ambiental, debido a que sus residuos son localizados principalmente en el agua. Estos compuestos se filtran en el subsuelo y contaminan los mantos freáticos subterráneos, facilitando así su transporte (Wirén-Lehr *et al.*, 2001). Pesticidas organoclorados como el 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano, mejor conocido como DDT, lindano y aldrinas (aldrina, dieldrina, endosulfano), han sido utilizados en grandes cantidades desde 1940. En la tabla 1 se muestra la persistencia en el medio ambiente de algunos de estos compuestos.

Tabla 1. Persistencia de algunos pesticidas en el medio ambiente.

Compuesto	Tiempo para la desaparición del 75-100%
Insecticidas Clorados	
Heptacloro	2 años
Aldrín	3 años
Lindano	3 años
DDT	4 años
Clordano	5 años
Insecticidas Organoclorados	
Malatión	1 semana
Paratión	1 semana
Diazinón	12 semanas
Herbicidas	
2,4-D(ácido 2,4-diclorofenoxiacético)	4 semanas
Dalapín	8 semanas
2,4,5T(ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético)	20 semanas
Atrazina	40 semanas
Simazina	48 semanas
Propazina	78 semanas

Fuente: Swoboda-Colberg, 1995.

Los herbicidas organoclorados como el ácido 2-4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido 2,4,5 triclorofenoxiacético (2,4,5-T) y el ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA), también son utilizados ampliamente, generando la contaminación con dioxinas. Los compuestos organoclorados son persistentes en el ambiente y se bioacumulan por medio de la cadena alimenticia, observándose su efecto tóxico en la disminución de la población en los niveles superiores de la cadena alimenticia (Pointing, 2001). En la figura 3 se muestran algunas estructuras de estos compuestos.

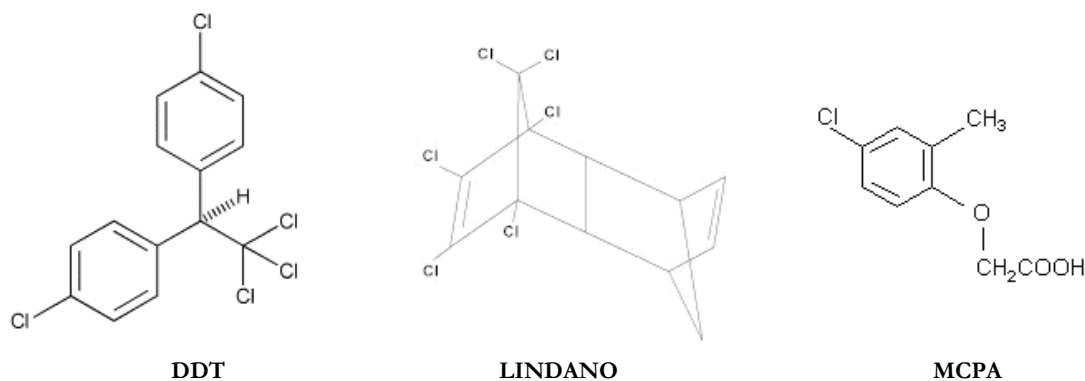


Figura 3. Estructuras químicas de pesticidas.

2.3. Eliminación biológica de xenobióticos

Los procesos mediante los cuales se puede llevar a cabo la eliminación biológica de compuestos contaminantes del ambiente, ya sea por remoción o degradación, se denominan procesos de biorremediación. Estos comprenden el uso de microorganismos, enzimas o diferentes organismos vegetales para cumplir este fin.

La remediación microbiana consiste en el uso de los microorganismos directamente en el lugar de incidencia de la contaminación. Estos microorganismos pueden ser originarios del sitio a tratar o, bien, de otros ecosistemas, en cuyo caso deben ser inoculados en el sitio contaminado. Si en el sitio existen microorganismos con la capacidad de degradar el contaminante, suele administrársele nutrientes con el fin de acelerar el proceso de biodegradación. Otra opción es la de introducir cepas modificadas por técnicas de ingeniería genética, en las cuales se han introducido genes que codifican para una o más enzimas detoxificadoras. Sin embargo, existen estrictas legislaciones internacionales respecto a la liberación de organismos genéticamente modificados (OGMs) en el medio ambiente (Paul *et al.*, 2005).

Por otro lado, la fitorremediación se puede definir como el conjunto de métodos para degradar, asimilar, metabolizar o detoxificar metales pesados, compuestos orgánicos, radioactivos y derivados del petróleo por medio de la utilización de plantas que tengan la capacidad fisiológica y bioquímica para absorber, retener, degradar o transformar estos contaminantes a formas menos tóxicas. Existen plantas que tienen esta capacidad intrínseca pero también pueden obtenerse plantas con estas capacidades por medio de técnicas de ingeniería genética (Cunningham y Ow, 1996).

La degradación enzimática consiste en la utilización de enzimas en el sitio contaminado con el fin de degradar las sustancias nocivas. Desde hace algunos años el uso de enzimas se ha convertido en una alternativa atractiva, debido a que son sistemas de biorremediación más simples que los microorganismos completos (Pieper *et al.*, 2004; Sutherland *et al.*, 2004) Dichas enzimas pueden ser previamente producidas a gran escala en bacterias transformadas genéticamente con el gen que codifica para cada enzima en particular (Ahuja *et al.*, 2004).

2.3.1. Uso de enzimas en la biodegradación de xenobióticos

El avance más promisorio en el biotratamiento de residuos y contaminantes industriales es la explotación de las capacidades catabólicas de los microorganismos, las cuales permiten la biorremediación de ambientes altamente contaminados con compuestos orgánicos. Se han realizado grandes esfuerzos para la identificación y caracterización de las enzimas y compuestos responsables de la transformación y/o degradación de xenobióticos en el metabolismo microbiano (Atlas, 1981; Buitrón *et al.*, 1998; Fujita *et al.*, 2000; Kanaly y Harayama, 2000; Shetty *et al.*, 2000; Estevez-Nuñez *et al.*, 2001; Kononova y Nesmeyanova, 2002; Murialdo *et al.*, 2003; Rabinovich *et al.*, 2004).

En estudios recientes se han utilizado diferentes tipos de oxidoreductasas para degradar diferentes sustancias contaminantes. Las lacasas de diferentes microorganismos se han utilizado en la biotransformación de una diversidad de compuestos contaminantes, como HPAs, fenoles, compuestos organoclorados y bencenos, en presencia de mediadores redox (Xu, 1996; Minussi *et al.*, 2002; D'Acunzo *et al.*, 2006). Gianfreda y Bollag, (2002) estudiaron el potencial de las lacasas de *Trametes versicolor*, *Rhizoctonia praticola* y la de *Trametes villosa*, en la biorremediación de suelos contaminados con 2,4-diclorofenol, logrando la disminución de la concentración de este contaminante en el suelo hasta en un 66%, como resultado de la actividad enzimática.

Algunas enzimas, como la lignino peroxidasa (Hammel *et al.*, 1986; Vazquez-Duhalt *et al.*, 1994) y la manganeso peroxidasa (Bogan *et al.*, 1996), además de hemoproteínas no enzimáticas como el citocromo c (Torres *et al.*, 1995) y la hemoglobina (Ortiz-Leon *et al.*, 1995; Torres y Vazquez-Duhalt, 2000), tienen la capacidad de catalizar la modificación de HPAs en presencia de peróxido de hidrógeno, obteniéndose como productos de oxidación principalmente quinonas y compuestos hidroxilados, los cuales presentan una mutagenicidad reducida (Durant *et al.*, 1996). Adicionalmente, al ser compuestos oxidados, su biodisponibilidad aumenta, permitiendo una más fácil biodegradación (Stuki y Alexander, 1987; Vazquez-Duhalt, 1998).

2.4. Hemoproteínas

Las hemoproteínas poseen un impresionante número de funciones biológicas, tales como la transferencia de electrones, el transporte y almacenamiento de oxígeno, la reducción del oxígeno a peróxido de hidrógeno o agua, oxigenación de sustratos orgánicos y la reducción de peróxidos. La versatilidad de funciones de las hemoproteínas radica en las diferencias tanto a nivel polipeptídico como en la de los constituyentes del grupo hemoprostético. Dentro de las hemoproteínas más estudiadas se encuentran: la peroxidasa de rábano blanco, la manganeso peroxidasa, la lignino peroxidasa, la peroxidasa versátil, la lactoperoxidasa y, sobre todo, el citocromo c (Vazquez-Duhalt, 1999).

2.4.1. Citocromo c


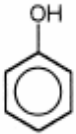
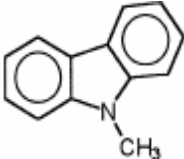
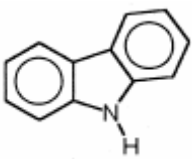

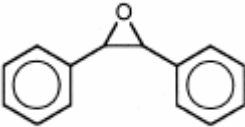
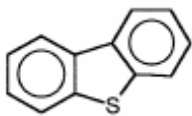
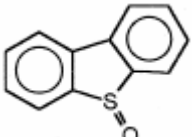
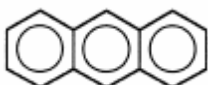
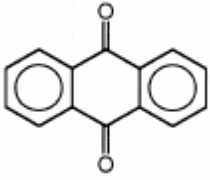
Dentro de las células, el citocromo c forma parte del sistema mitocondrial de transporte de electrones. Esta proteína tiene un grupo hemoprostético covalentemente unido mediante dos enlaces tioéter entre los residuos de cisteína de la proteína y el grupo vinil del grupo hemo. Las peroxidasas de mamíferos y los citocromos del tipo c son las únicas hemoproteínas con un grupo hemo covalentemente unido (DePillis *et al.*, 1997).

El citocromo c es una proteína presente en todos los organismos eucariontes y la secuencia de muchas de estas proteínas ha sido determinada, permitiendo trazar la filogenia de los eucariontes (Dickerson, 1980). La comparación de las secuencias y estructuras cristalográficas de cinco citocromos c eucariontes y seis bacterianos demostró que el citocromo c se encuentra altamente conservado entre los organismos y que este alto grado de identidad se expresa en una gran similitud estructural en estas proteínas.

2.4.1.1. Actividad biocatalítica del citocromo c

En los sistemas vivos no se ha reportado ninguna actividad catalítica del citocromo c. Sin embargo, *in vitro*, se ha reportado la habilidad del citocromo c para inducir la peroxidación de lípidos, así como en la ruptura de hidroperóxido (Tappel, 1955). Además, el citocromo c fue capaz de catalizar la hidroxilación de 4-nitrofenol (Florence, 1985) y la oxidación de ácido 2-ceto-4-tiometil butírico (Harel y Kenner, 1985) en presencia de peróxido de hidrógeno. En la tabla 2 se muestran algunas de las principales biotransformaciones catalizadas por el citocromo c.

Tabla 2. Principales biotransformaciones catalizadas por el citocromo c.

Reacción	Sustrato	Producto	Referencia
Hidroxilación	Benceno 	Fenol 	Akasaka <i>et al.</i> , 1994
N-demetilación	N-metilcarbazol 	N-hidroximetilcarbazol 	Akasaka <i>et al.</i> , 1993
Epoxidación	Estilbeno 	Estilben-epóxido 	Akasaka <i>et al.</i> , 1993
S-oxidación	Dibenzotiofeno 	Dibenzotiofeno sulfóxido 	Vazquez-Duhalt <i>et al.</i> , 1993a
Oxidación de hidrocarburos poliaromáticos	Antraceno 	9,10-Antraquinona 	Torres <i>et al.</i> , 1995

La actividad tipo peroxidasa del citocromo c se ha demostrado en la oxidación de diferentes donadores de electrones entre los que se encuentran ABTS (ácido 2-2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y 4-aminoantipirina (Radi *et al.*, 1991). Reacciones oxidativas como *N* y *O*-demetilaciones, *S*-oxidaciones y epoxidaciones de olefinas, usuales del citocromo P450, fueron realizadas en presencia del citocromo c y de peróxido de hidrógeno u otros hidroperóxidos orgánicos (Akasaka *et al.*, 1993). Como el citocromo P450, el citocromo c ha sido utilizado como biocatalizador en la oxidación de tiofenos y compuestos organoazufrados en sulfóxidos (Klyachko y Klivanov, 1992; Vazquez-Duhalt *et al.*, 1993a).

La primera oxidación de un hidrocarburo aromático mediada por citocromo c en presencia de peróxido de hidrógeno fue reportada por Akasaka y colaboradores en 1994. La hidroxilación de benceno fue llevada a cabo en una mezcla de solvente orgánico y 5% de agua, con la proteína inmovilizada, mientras que el citocromo c libre no pudo realizar esta reacción. Usando el isótopo ^{18}O como etiqueta, los autores demostraron que dos tercios del oxígeno presente en el fenol producido provenían del hidroperóxido y el tercio restante del oxígeno molecular. En 1995, Torres y colaboradores reportaron que el citocromo c proveniente de *S. cerevisiae* pudo realizar la oxidación de HPAs en un sistema que contenía 10% de acetonitrilo y 1 mM de peróxido de hidrógeno. La actividad catalítica del citocromo c se ha reportado en proteínas de diferentes fuentes (animal, bacteriana y de levaduras).

Gracias a su sitio catalítico (hemo), el citocromo c es capaz de realizar reacciones del tipo peroxidasa. Una gran cantidad de sustratos pueden ser modificados por la acción de esta proteína en presencia de peróxido de hidrógeno u otros hidroperóxidos orgánicos. Puede realizar la oxidación de fenoles sustituidos, sulfuros orgánicos, tiofenos y HPAs. Además de reacciones con ABTS, guayacol y luminol, también puede realizar la peroxidación de lípidos y *N*-*O*-demetilaciones. Dado el riesgo potencial que representan algunos de estos compuestos para la salud humana, debido a sus posibles actividades carcinogénicas y mutagénicas, el citocromo c se ha propuesto como biocatalizador para propósitos ambientales (Vazquez-Duhalt, 1999). En la tabla 3 se enumeran algunos de los principales sustratos de las reacciones biocatalíticas del citocromo c y los productos de reacción.

Tabla 3. Sustratos y productos de las reacciones biocatalíticas del citocromo c.

Sustratos	Productos
Hidrocarburos polinucleoaromáticos	
Antraceno	9,10-Antraquinona
Benceno	Fenol
Benzo (α) pireno	1,6-Benzo (α) pirenodiona
Pireno	1,8-Pirenodiona
Compuestos organoazufrados y heterocíclicos	
Benzotiofeno	Sulfóxido de benzotiofeno
Carbazol	No reportado
Dibenzotiofeno	Sulfóxido de dibenzotiofeno
Sulfuro de dibencilo	Sulfóxido de dibencilo
Sulfuro de difenilo	Sulfóxido de difenilo
N-metil carbazol	N-hidroximetil carbazol
Tiantreno	Disulfóxido de tiantreno
Tioanisol	Metilfenil sulfóxido
Otros sustratos	
ABTS	ABTS (radical catiónico)
Guayacol	Tetraguayacol
Ácido linolénico	Peróxido de linoleato
Luminol	Quimioluminiscencia
Estilbeno	Epóxido de estilbeno

Fuente: Vazquez-Duhalt, 1999.

2.4.1.2. Citocromo c, una proteína robusta

El citocromo c presenta varias ventajas para su uso como biocatalizador.

a) El grupo hemo prostético se encuentra unido covalentemente a la proteína. Esta propiedad puede ser importante para la catálisis en presencia de solventes orgánicos, debido a que el citocromo c no pierde este grupo en presencia de solventes, como normalmente ocurre con las peroxidasas (Vazquez-Duhalt, 1999).

b) El citocromo c mantiene actividad catalítica en un amplio intervalo de pH (fig. 4) (Vazquez-Duhalt *et al.*, 1993a).

c) Conserva actividad biocatalítica en altas concentraciones de solventes orgánicos. Citocromos c de diferentes fuentes presentaron alta actividad catalítica en 90% de tetrahidrofurano (Vazquez-Duhalt *et al.*, 1993b).

d) El citocromo c de corazón de caballo es capaz de realizar reacciones biocatalíticas a temperaturas tan altas como 120 °C, con una actividad máxima a 80 °C. Además, después de su modificación química con polietilenglicol (PEG), la termoestabilidad se incrementa notablemente (fig. 5).

e) Finalmente, esta proteína tiene un costo bajo. El costo y la estabilidad son los principales factores para la biocatálisis en gran escala.

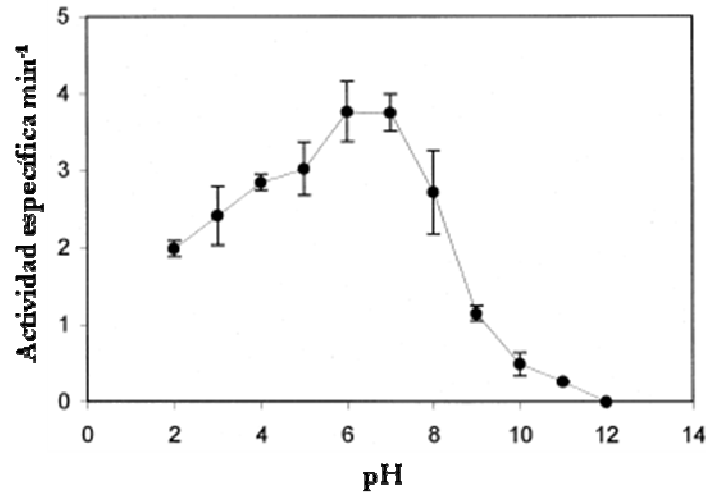


Figura 4. Efecto del pH en la oxidación biocatalítica de dibenzotiofeno por citocromo c en presencia de 1 mM de peróxido de hidrógeno (Vazquez-Duhalt *et al.*, 1993a).

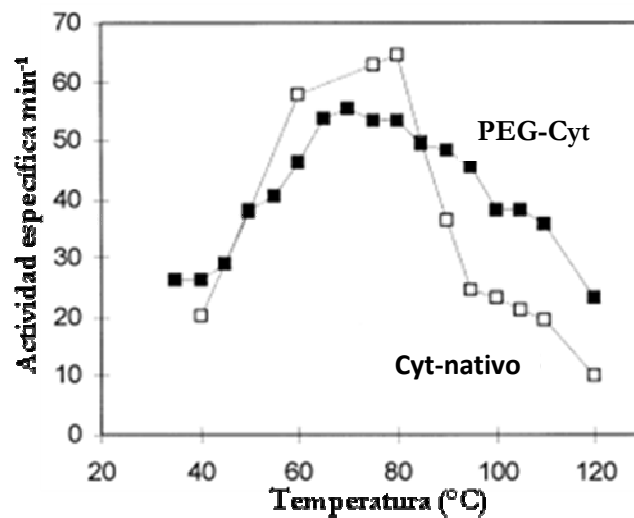


Figura 5. Efecto de la temperatura en la oxidación biocatalítica de cloruro de pinacianol por los citocromos c nativo y modificado con polietilenglicol (García-Arellano *et al.*, 2002).

2.4.1.3. Modificación química del citocromo c

Como se mencionó anteriormente, el citocromo c es una proteína muy estable, por lo que es posible realizar una gran variedad de reacciones químicas sobre ella sin afectar su actividad. Con la modificación química de los grupos reactivos del citocromo c se ha demostrado que es posible alterar tanto la actividad, como la especificidad hacia el sustrato, lo que pone de manifiesto el potencial de esta herramienta en el diseño de biocatalizadores con propósitos ambientales (Vazquez-Duhalt, 1999). Con la modificación de los grupos amino libres de la superficie proteínica, se puede modificar significativamente las propiedades de solubilidad de la molécula, permitiendo así, obtener un biocatalizador completamente soluble en solventes orgánicos, reduciendo limitaciones de transferencia de masa en sistemas de reacción con sustratos hidrofóbicos.

Fujita y colaboradores (1994), incrementaron la actividad peroxidasa del citocromo c en la oxidación de guayacol uniendo al citocromo c a una membrana de fosfolípidos. El incremento fue atribuido a la interacción entre las cargas negativas de la membrana y las cargas positivas de la superficie de la proteína. La modificación química ha sido utilizada en el citocromo c de corazón de caballo para aumentar su estabilidad y número de sustratos (Akasaka *et al.*, 1993; Vazquez-Duhalt *et al.*, 1993b; Tinoco y Vazquez-Duhalt., 1998). Diferentes agentes químicos han sido utilizados para modificar los grupos amino libres del citocromo c alterando significativamente sus constantes cinéticas (Tinoco y Vazquez-Duhalt., 1998), mientras que la modificación química con polietilenglicol aumentó tanto su actividad como su eficiencia catalítica en un sistema que contenía 90% de tetrahidrofurano (Vazquez-Duhalt *et al.*, 1993b).

Se preparó una variante de citocromo c con una doble modificación, la cual consistía en la pegilación de los grupos aminos libres y la metilación de los grupos carboxilos libres, incluidos los propionatos del hemo. Esta preparación fue capaz de oxidar 16 compuestos aromáticos de 20 ensayados, mientras que la proteína no modificada sólo pudo oxidar 8 compuestos (Tinoco y Vazquez-Duhalt, 1998) (tabla 4).

Tabla 4. Oxidación de hidrocarburos poliaromáticos por los citocromos c nativo y PEG-Cyt-MET (Tinoco y Vazquez-Duhalt, 1998).

Compuesto	Actividad Específica (min^{-1})	
	Citocromo c nativo	PEG-Cyt-Met
7,12-Dimetilbenzantraceno	24.59	80.33
Azuleno	2.26	14.32
3-Metilcolantreno	1.88	10.96
Dibenzotiofeno	0.67	4.73
Antraceno	0.33	3.09
Tiantreno	0.49	1.41
Pireno	0.51	0.97
Benzo(α)pireno	0.22	0.39
1,2:3,4-Dibenzantraceno	RN	16.6
7-Metilbenzo(α)pireno	RN	7.56
1,2:5,6-Dibenzantraceno	RN	5.70
Trifenileno	RN	5.27
Fluorantreno	RN	0.65
Acenafteno	RN	0.40
Fluoreno	RN	0.22
Fenantreno	RN	0.17
Criseno	RN	RN
9,10-Dimetilantraceno	RN	RN
Naftaleno	RN	RN
Bifenilo	RN	RN

RN= Reacción no detectada

En (2002), García-Arellano y colaboradores modificaron al citocromo c con polietilenglicol, en este estudio el citocromo c modificado fue capaz de realizar reacciones de oxidación por encima de 120 °C con una actividad máxima a 80 °C, la modificación química con polietilenglicol mejoró ampliamente la termoestabilidad de esta proteína. El citocromo c no modificado fue totalmente inactivado después de 3 horas a una temperatura de 80 °C, mientras que el citocromo c modificado con polietilenglicol conservó el 40% de su actividad inicial después de 7 horas de incubación a 80 °C. Este efecto se incrementó cuando la proteína fue incubada en presencia de sustrato, conservando el 100 % de su actividad inicial después de 7 horas de incubación a 80 °C (fig. 6).

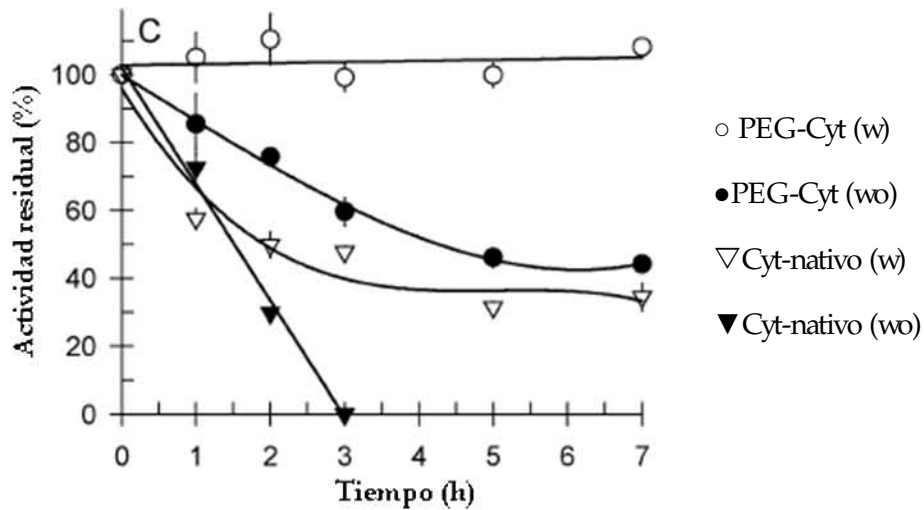


Figura 6. Termostabilidad de los citocromos c nativo y modificado con polietilenglicol. Las proteínas se incubaron a 80°C por diferentes tiempos con (w) y sin (wo) cloruro de pinacianol. La actividad fue iniciada con la adición de peróxido de hidrógeno. Finalmente la actividad residual fue medida a temperatura ambiente (25°C) (García-Arellano *et al.*, 2002).

2.4.1.4. Ingeniería genética del citocromo c

El desarrollo de los procedimientos de genética molecular y el ADN recombinante ha permitido la expresión de citocromos c mutantes en cultivos de *S. cerevisiae*, haciendo posible el cambio de cualquier aminoácido (Mauk, 1991). En 1995, Fumo y colaboradores realizaron la mutagénesis de iso-1-citocromo c, utilizando técnicas de PCR (del inglés, Polymerase Chain Reaction) y transformación en *E. coli*. Mediante mutagénesis sitio-dirigida en citocromo c de *S. cerevisiae*, Torres y colaboradores (1995) encontraron que la sustitución del residuo fenilalanina 82 alteró significativamente el comportamiento de esta proteína cuando se mutó por glicina presentando un aumento de 10 veces en la eficiencia catalítica comparada con la proteína nativa en la oxidación de cloruro de pinacianol.

En la oxidación de pireno y cloruro de pinacianol, variantes de citocromo c presentaron diferentes constantes catalíticas (k_{cat}) (Torres *et al.*, 1995; Villegas *et al.*, 2000). Dentro de las variantes utilizadas, K79A (residuo situado en el acceso del solvente hacia el grupo hemo) presentó un incremento en k_{cat} , pero también con una K_M mayor, lo que resultó en una eficiencia catalítica similar (tabla 5).

Tabla 5. Constantes cinéticas del citocromo c nativo y las variantes en la oxidación de cloruro de pinacianol (Torres *et al.*, 1995) y pireno (Villegas *et al.*, 2000).

Variante	k_{cat} (s^{-1})	$K_{M,ap}$ (mM)	$k_{cat}/K_{M,ap}$ ($s^{-1}mM^{-1}$)
Oxidación de cloruro de pinacianol			
F82G;C102T	33.93	17.1	1959
F82Y;C102T	13.86	11.7	1087
F82S;C102T	8.69	4.6	1874
F82W;C102T	5.65	8.5	662
F82A;C102T	4.77	11.2	425
Nativa	2.97	10.5	284
C102T	2.31	12	192
Oxidación de pireno			
K79A;C102T	3.28	101.8	32
K87A;C102T	0.39	3.9	99
Nativa	0.31	9.7	32
K73A;C102T	0.28	7.5	38
N52A;C102T	0.18	4.7	39
K86A;C102T	0.17	4.0	33
X72A;C102T	0.13	4.0	33
Y67F;C102T	0.10	3.3	32

ap = Aparente

Al igual que las peroxidasas, el citocromo c se inactiva en presencia de peróxido. Valderrama y colaboradores (2006), por medio de mutagénesis sitio dirigida obtuvieron una nueva variante de citocromo c (N52I/W59F/Y67F/K79A/F82G), estable a la inactivación por peróxido de hidrógeno. Esta variante presentó estabilidad a una concentración de 1 mM de peróxido de hidrógeno y mostró un tiempo de vida media de 2172 segundos en presencia de una concentración 10 mM de peróxido de hidrógeno (fig. 7).

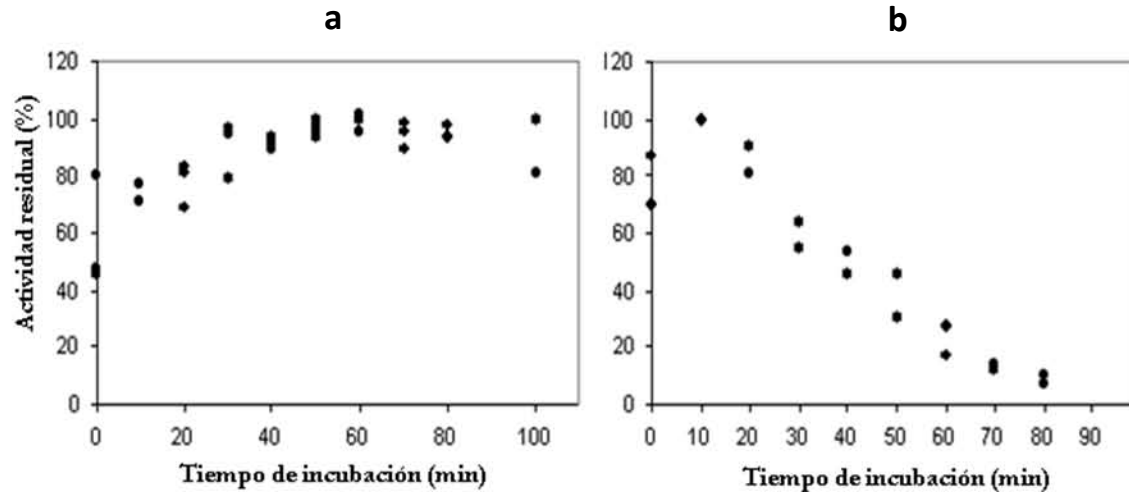


Figura 7. Estabilidad del citocromo c de *S. cerevisiae* B102, variante estable al peróxido de hidrógeno, a concentraciones de 1 mM (a) y 10 mM (b) de peróxido de hidrógeno. (Valderrama *et al.*, 2006).

El diseño de proteínas mediante mutagénesis sitio dirigida es un campo biotecnológico promisorio. Como se ha demostrado en el caso del citocromo c, la ingeniería de proteínas puede ser capaz de resolver algunos problemas de aplicación mediante el cambio de propiedades específicas de las proteínas. La actividad de estas proteínas puede ser mejorada por medio de la modificación de la cavidad del sitio activo. Estas modificaciones pueden ser racionales, permitiendo la apertura del acceso de los sustratos o cambiando la afinidad a estos. Además, estos datos sugieren que la mutagénesis sitio dirigida puede ser una herramienta biotecnológica útil para el diseño de biocatalizadores más estables.

2.5. Potencial redox y capacidad catalítica de las hemoproteínas

Las reacciones de oxido-reducción o redox son reacciones de transferencia de electrones entre especies químicas. Para que estas reacciones se realicen se necesita la presencia de una especie que ceda electrones (reductor) y otra que los acepte (oxidante). Los procesos redox tienen gran relevancia a nivel biológico. Estos procesos están involucrados en la cadena de reacciones químicas de la **fotosíntesis** y de la **respiración**, procesos fundamentales para la vida de muchos tipos de organismos.

El potencial redox (E°) se define como la diferencia entre el potencial de reducción y el de oxidación de una especie química (ecuación 1); por lo que entre más positivo es el valor del potencial redox, mayor será la capacidad oxidante de la especie química.

$$E^\circ = E_{\text{Reducción}} - E_{\text{Oxidación}} \quad (1)$$

El potencial redox de las peroxidasas, entre otros factores como la topología del sitio activo y la accesibilidad de solventes y sustratos, está íntimamente relacionado con su capacidad oxidativa (Dunford, 1999; Ayala *et al.*, 2007), por lo que la determinación del potencial redox de estas proteínas es indispensable para su aplicación en procesos de biocatálisis ambiental. Sin embargo, la determinación de esta propiedad es difícil de realizar, debido a la alta inestabilidad de los compuestos I y II (intermediarios catalíticos y responsables de la actividad de estas enzimas). Por lo anterior, se han realizado estudios con diferentes enfoques con la finalidad de evaluar la capacidad oxidante de estas hemoproteínas. Métodos directos como la voltametría han sido utilizados para medir el potencial redox de la pareja Fe (II)/Fe (III), aunque esta pareja no se encuentra en el ciclo catalítico de las peroxidasas. En la figura 8 se muestra el ciclo catalítico del citocromo c.

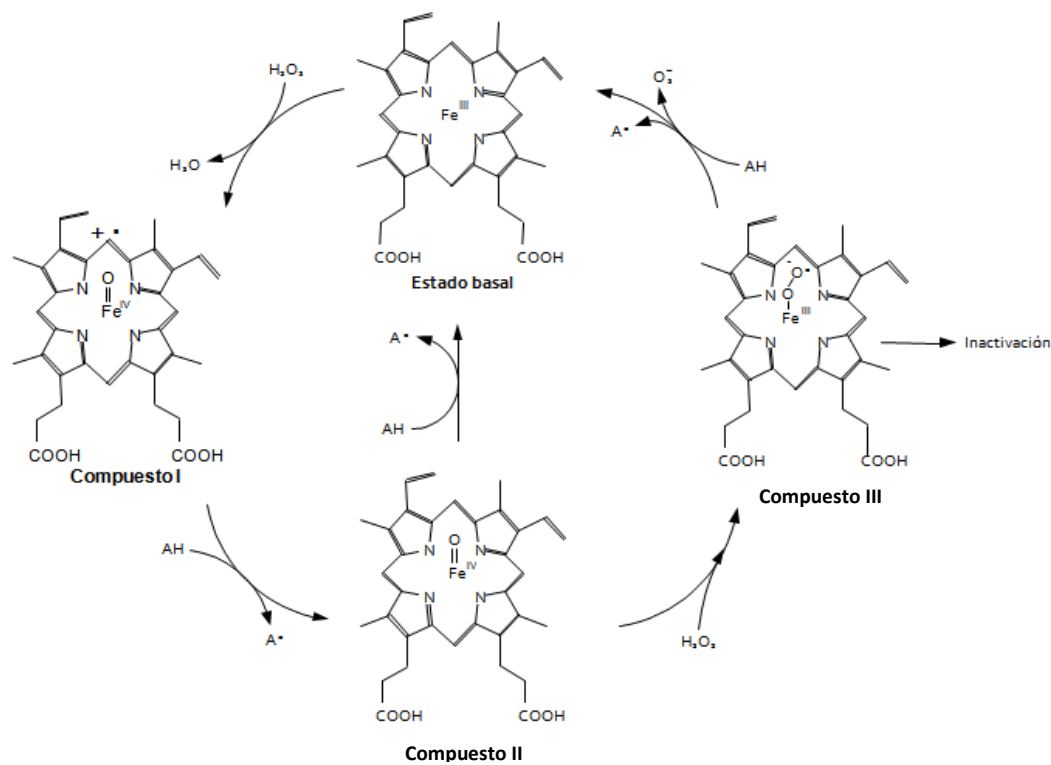


Figura 8. Ciclo catalítico del citocromo c en presencia de peróxido de hidrógeno y un sustrato aromático (AH). Adaptado de Vazquez-Duhalt (1998).

Barr y Mason (1995), describieron el ciclo catalítico del citocromo c. Al igual que en las peroxidasas la molécula de hierro del grupo hemoprostético (FeIII) rompe el enlace O-O del peróxido, dando lugar a la formación de un radical catiónico (compuesto I). La presencia de un agente reductor, como por ejemplo fenoles y HPAs, genera el compuesto II, este complejo es formado entre el hierro (IV) y el oxígeno resultante de la escisión del peróxido. Este compuesto puede oxidar una segunda molécula de sustrato para regresar al estado basal del citocromo c. Alternativamente, un exceso de peróxido da lugar a la formación del compuesto III, radical altamente reactivo localizado cerca del anillo de la porfirina y, debido a esta proximidad, cualquier transferencia de electrones desde el estado reducido del citocromo formará un radical hidroxilo. Este radical puede reaccionar con el anillo de porfirina llevando a una inactivación irreversible de la proteína. Todas las peroxidasas son inactivadas por un exceso de peróxido.

En el caso de algunas peroxidasas, en las que el compuesto I y el compuesto II poseen una mayor estabilidad, el potencial redox de estas proteínas se ha estimado por métodos indirectos basados en determinaciones espectrales del equilibrio entre especies de alto estado de oxidación de las enzimas. En un reporte reciente de Ayala y colaboradores (2007), se estimó el potencial redox de la pareja compuesto II/Fe (III) de cinco diferentes peroxidasas, basándose en la teoría de la transferencia de electrones en la esfera exterior propuesta por Marcus y Sutin (1985). En este reporte se determinó el potencial redox midiendo las velocidades iniciales de oxidación de compuestos fenólicos *p*-sustituidos con diferentes potenciales redox, obteniendo valores para el potencial redox de la pareja compuesto II/Fe (III) similares a los obtenidos por otros métodos indirectos reportados por otros autores (tabla 6).

Esta metodología permite estimar el potencial redox de las peroxidasas basándose directamente en su actividad, contribuyendo al entendimiento del mecanismo catalítico de las peroxidasas. Además, este enfoque se presenta como una herramienta accesible y rápida para la determinación del potencial catalítico de nuevas peroxidasas o de peroxidasas obtenidas por ingeniería de proteínas, facilitando su caracterización.

Tabla 6. Potenciales redox de diferentes peroxidases.

Peroxidasa	Potencial redox (Volts) compuesto II/Fe(III)
Peroxidasa versátil de <i>B. adusta</i>	1.37±0.19
Peroxidasa de <i>C. cinereus</i>	1.18±0.15
Lactoperoxidasa bovina	0.98±0.13
Peroxidasa de soya	0.95±0.13
Peroxidasa de rábano blanco	0.89±0.10

Fuente: Ayala et al., 2007.

3. HIPÓTESIS

Mediante el uso de modificaciones químicas y genéticas será posible modular el potencial de oxido-reducción del citocromo c de *Saccharomyces cerevisiae* y así mejorar sus propiedades catalíticas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Estudiar el efecto de las modificaciones químicas y las mutaciones puntuales sobre el potencial de oxido-reducción y la capacidad catalítica del citocromo c de *Saccharomyces cerevisiae*.

4.2. Objetivos particulares

1. Seleccionar variantes o preparaciones de citocromo c que presenten actividades catalíticas mayores que el citocromo c nativo.
2. Estudiar la actividad catalítica de las variantes o preparaciones de citocromo c seleccionadas en la biotransformación de diferentes compuestos fenólicos.
3. Estimar el potencial redox de la pareja compuesto II/ estado basal, etapa limitante en el ciclo catalítico del citocromo c, de las variantes seleccionadas.

Analizar el efecto de las mutaciones puntuales en las variantes de citocromo c, sobre la estructura proteica y conformación de la cavidad hemoprostética

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos y solventes

El citocromo c de *S. cerevisiae*, el peróxido de hidrógeno (solución acuosa 30%), el metoxipolietilenglicol activado con cloruro cianúrico, el trifluoruro de boro metanólico y los sustratos ensayados, fueron obtenidos de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Los solventes orgánicos, todos de grado HPLC (del inglés, High Performance Liquid Chromatography), fueron obtenidos de Fisher Scientific (Fairlawn, NJ). El hidrocloreuro de guanidina (GuHCl) grado ultra puro se obtuvo de Gibco BRL.

5.2. Modificación química del citocromo c

Se realizó la modificación química del citocromos c de *S. cerevisiae* con polietilenglicol (PEG, 5000 Da) en los grupos amino y la metilación de los grupos carboxilos de las proteínas. Se preparó una solución de citocromo c y se midió su concentración por el método de Bradford. La modificación química con polietilenglicol se realizó sobre los grupos amino de las lisinas de la proteína. El citocromo c de *S. cerevisiae* presenta 15 lisinas en su estructura, por lo que para realizar la modificación química el PEG se agregó en un exceso molar de 5 veces con respecto a las lisinas presentes.

La reacción de modificación con PEG se realizó en un volumen de 10 mL (8 mL de amortiguador de boratos, 40 mM, pH 10, y 2 mL de la solución de citocromo c) y se dejó reaccionar por espacio de 1 hora. Después las mezclas de reacción se diluyeron en 30 mL de amortiguador de fosfatos (AFS) (60 mM, pH 6.1). Posteriormente se dializaron y concentraron exhaustivamente en un sistema de ultrafiltración (Amicon 8050), utilizando una membrana con un corte molecular de 10, 000 Da. El concentrado obtenido fue liofilizado (Labconco FreeZone Dry System 4.5 L) para realizar la metilación de los grupos carboxílicos. Las proteínas (PEG-Cyt) liofilizadas se resuspendieron en 3 mL de dimetilformamida y se le agregaron 2 mL de trifluoruro de boro metanólico, se dejó reaccionar por una hora. Posteriormente se dializaron y concentraron obteniéndose la preparación PEG-Cyt-MET.

5.3. Mutantes de *cyc1* de *S. cerevisiae*, expresión heteróloga en *E. coli* y purificación

Todas las mutantes ensayadas fueron obtenidas de la colección de proteínas de expresión heteróloga perteneciente al Laboratorio de Biocatálisis Ambiental, (Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología, UNAM). En la tabla 7 se presentan las variantes estudiadas en este trabajo.

Tabla 7. Variantes de citocromo c estudiadas en este trabajo.

Variante de Citocromo c	Mutaciones
Citocromo c (Nativo)	-
Citocromo WT 16	T-5A/C102T
Citocromo M1	T-5A/N52I/Y67F/C102T
Citocromo M2	T-5A/N52I/Y67F/M80A/C102T
Citocromo M3	T-5A/N52I/W59F/Y67F/K79A/C102T
Citocromo M4	T-5A/N52I/W59F/Y67F/M80I/C102T
Citocromo M5	T-5A/N52I/W59F/Y67F/F82G/C102T
Citocromo M6	T-5A/N52I/W59F/Y67F/K79A/F8G/C102T
Citocromo M7	T-5A/N52I/W59F/Y67F/K79T/F82G/C102T

Las mutantes fueron construidas utilizando el protocolo experimental ya reportado (Horton y Pease, 1991). La cepa de *E. coli* JM101 se transformó con los plásmidos obtenidos anteriormente, conservándolos en un medio rico Luria-Bertani (LB) (Ausubel *et al.*, 1999) suplementado con 100 µg/mL de ampicilina.

La producción de los citocromos c mutantes se llevó a cabo creciendo las cepas transformadas de *E. coli* en un fermentador con un volumen de operación de 1.5 L en medio LB suplementado con ampicilina (300 r.p.m., 0.33 v.v.m. y 37 °C). La inspección visual de paquetes celulares obtenidos a intervalos regulares indicó que la acumulación de citocromo c se inició una vez que el cultivo alcanzó la fase estacionaria (las células de las cepas sobreproductoras de citocromo c desarrollaron un color rosa tenue) (García-Arellano *et al.*, 2002).

Después de 30 h las células fueron cosechadas por centrifugación. El paquete celular (5g, de peso húmedo) se resuspendió en 50 mL de AFS (10 mM, pH 6.1) conteniendo 25% de sacarosa, 10 mM de EDTA, 0.2 mM de ditioneitol y 50 µg/mL de lisozima y fue incubado por 10 min en hielo. A esta suspensión se le adicionaron 5 mg/mL del detergente Brij35, 0.01 mM de MgCl₂, 20 µg/mL de RNAsa, 100 µg/mL de DNAsa y 1 mM de PMSF (del inglés Phenylmethylsulphonyl fluoride, inhibidor de serín-proteasas) y se incubó por 10 min a 37°C. Las células se rompieron por sonicación con ciclos alternados de 1 min. Los restos celulares fueron removidos por centrifugación (12,100 g) y el extracto celular fue precipitado con sulfato de amonio (50% de saturación). El precipitado formado se separó mediante centrifugación y el sobrenadante fue dializado en frío contra 80 volúmenes de AFS (10 mM, pH 6.1).

Los extractos dializados se cargaron en una columna empacada con el soporte de intercambio catiónico Macro Prep-High S y fueron eluidos mediante un gradiente lineal de 0 a 1 M de NaCl a un flujo de 1.5 ml/min, en un equipo de cromatografía atmosférica (Bio Rad Econo System). La elución se siguió por absorbancia a 280 nm y 410 nm. Las fracciones ricas en citocromo c se colectaron y dializaron extensivamente en frío contra AFS (10mM, pH 6.1) y posteriormente se concentraron en un sistema de ultrafiltración equipado con una membrana de corte molecular de 10, 000 Da (Amicon 8050).

Todas las proteínas mutantes se purificaron a homogeneidad según se comprobó por geles de acrilamida teñidos con azul de Coomassie o nitrato de plata. La relación de absorbancias a 410 nm/280 nm, denominada coeficiente de Reinheitszahl (R_z), se utiliza como índice de pureza en hemoproteínas. El valor de R_z del citocromo comercial de sigma es 4.4, mientras que los valores para las proteínas mutantes obtenidas oscilaron entre 4.8 y 5.4. (García-Arellano *et al.*, 2002).

5.4. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína fue estimada por espectrometría UV-Vis (Beckman DU 650) en el estado oxidado usando un coeficiente de extinción molar (ϵ) con un valor de $1.601 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 410 nm (García-Arellano *et al.*, 2002) y confirmadas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando una curva estándar de citocromo c a concentraciones de 0 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

5.5. Ensayos de actividad de diferentes variantes de citocromo c en la oxidación de guayacol

Se determinó la actividad específica (en condiciones de velocidad inicial) de diferentes variantes y preparaciones químicas de citocromo c de *Saccharomyces cerevisiae* en la oxidación de guayacol. Los ensayos se realizaron en una mezcla de reacción que contenía AFS (60 mM/pH 6.1), 16 mM de guayacol, 4 mM de peróxido de hidrógeno y concentraciones fijas de los diferentes citocromos c, midiendo el aumento de absorbancia a 470 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650. Las reacciones se iniciaron agregando 4 mM de peróxido de hidrógeno y se tomó como control la ausencia de proteína. La actividad se determinó midiendo el número de moles de tetraguayacol producidas, utilizando un coeficiente de extinción molar de $26.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Chance y Maehly, 1955; DePillis *et al.*, 1997).

5.6. Ensayos de oxidación de compuestos fenólicos

Se determinó la actividad específica de los citocromos c en la oxidación de 11 diferentes compuestos fenólicos con potenciales de oxido-reducción entre 0.46 y 1.23 volts. Los ensayos se realizaron en una mezcla de reacción (1 mL) que contenía 2 mM de cada compuesto en AFS (60 mM/pH 6.1), concentraciones de los citocromos c ensayados que permitieran disminuciones en los picos de sustrato entre 20 y 80 % y finalmente la reacción se inició con la adición de 4 mM de peróxido de hidrógeno.

La actividad se determinó monitoreando la disminución del área de los picos de cada fenol por HPLC (Perkin-Elmer 235C), equipado con una columna C18, 150 mm x 3.9 mm, (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) y un detector UV de arreglo de diodos. La elución de los compuestos fenólicos se realizó utilizando una fase móvil de acetonitrilo:agua (80:20). Los compuestos fenólicos, sus potenciales redox, las longitudes de onda a las que fueron analizados, sus volúmenes moleculares y sus parámetros de hidrofobicidad ($\log P_{\text{octanol/agua}}$) se enlistan en la tabla 8.

Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos fenólicos ensayados.

Compuesto	Potencial redox (Volts) ^a	Longitud de onda (nm)	Volumen molecular (Å ³) ^b	Hidrofobicidad ($\log P_{\text{octanol/agua}}$) ^c
Hidroquinona	0.46	285	102.92	0.64±0.20
4-Metoxifenol	0.72	285	121.12	1.31±0.22
4-Etoxifenol	0.73	285	138.15	1.84±0.22
4-Etilfenol	0.87	275	128.99	2.47±0.19
p-Cresol	0.87	275	112.15	1.99±0.19
4-Clorofenol	0.94	280	108.16	2.43±0.22
4-Bromofenol	0.96	280	113.36	2.49±0.29
Fenol	0.97	270	94.74	1.48±0.19
4-Hidroxiacetofenona	0.98	275	136.65	1.42±0.24
4-Hidroxibenzonitrilo	1.17	245	127.77	1.42±0.22
4-Nitrofenol	1.23	320	122.01	1.57±0.22

^a= Lind *et al.*, 1990; ^b= calculado con Ampac y CODESSA; ^c= calculado con ChemSketch logPcalculator.

5.7. Estimación del potencial redox de los diferentes citocromos c

Con base en la teoría de transferencia de electrones en la esfera exterior, propuesta por Marcus y Sutin (1985) y el reporte de Ayala *et al.*, (2007), se determinaron los valores de potencial redox del compuesto II/estado basal Fe III (etapa limitante del ciclo catalítico), de la proteína nativa, la variante M2 y la preparación química PEG-Cyt-MET.

La metodología se basa en la correlación semilogarítmica existente entre los valores de actividad específica (k_{ET}) y el potencial redox (E°) de los compuestos fenólicos ensayados (fig. 9).

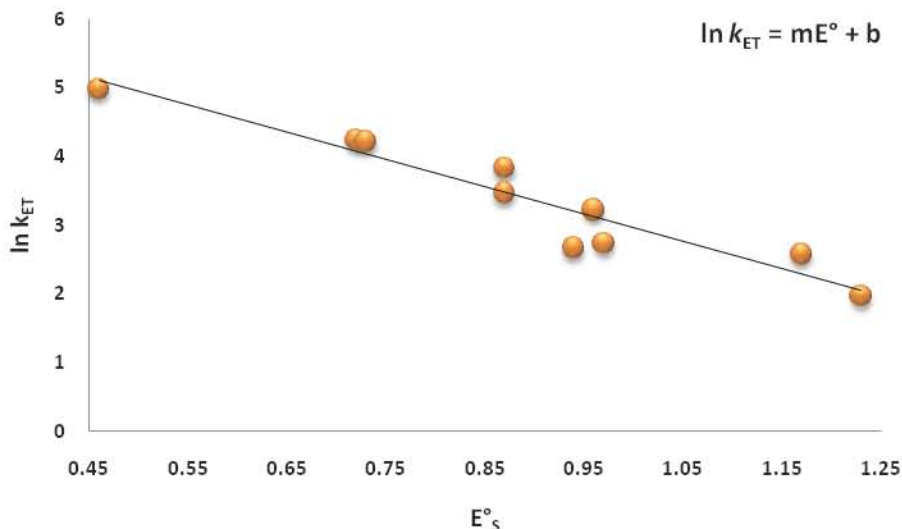


Figura 9. Correlación semilogarítmica entre la velocidad de transferencia de electrones (k_{ET}) y el potencial redox de los sustratos ensayados (E°_s) (Ayala *et al.*, 2007).

La peroxidasa de rábano blanco presenta el compuesto I más estable dentro de las peroxidasas, por lo que fue posible determinar su potencial redox (Folkes y Candeias, 1997). Estos autores, basándose en la ecuación de Marcus y Sutin (ecuación 2), midieron la energía presente en la reacción cuando el potencial redox del sustrato (E°_s) y el del compuesto I (E°_E) tenían el mismo valor ($E = 0$). Como resultado, observaron que la energía medida correspondía al 8% de la actividad obtenida en la oxidación de 4-metoxifenol (ecuación 3).

Ecuación de Marcus y Sutin:

$$\ln k_{ET} = \ln k_0 - \frac{\lambda}{4RT} + \frac{F\Delta E}{2RT} + \frac{F^2\Delta E^2}{4\lambda RT} \quad (2)$$

k_{ET} = Velocidad de transferencia de un electrón

k_0 = Velocidad de activación de la transferencia de un electrón en el complejo enzima-sustrato

λ = Energía de reorganización

E = Fuerza conductora de electrones

F = Constante de Faraday

R = Constante general de los gases

T = Temperatura absoluta

Cuando $E^{\circ}_S = E^{\circ}_E$, el valor de la fuerza conductora de electrones (E) es igual a cero

$$\ln k_{ET} = \ln k_0 - \frac{\lambda}{4RT} + \frac{F\Delta E}{2RT} + \frac{F^2\Delta E^2}{4RT} = \ln 0.08k_{ET \text{ 4-metoxifenol}} \quad (3)$$

$$\ln k_{ET} = \ln k_0 - \frac{\lambda}{4RT} = \ln 0.08k_{ET \text{ 4-metoxifenol}} \quad (4)$$

Ayala y colaboradores (2007), asumieron que este valor (ecuación 4), podría ser constante para todas las peroxidases y lo utilizaron para determinar el valor del potencial redox de las peroxidases evaluadas en su reporte. Utilizando la ecuación obtenida de la correlación semilogarítmica (ecuación 5) estimaron el potencial redox del sustrato (E°_S) correspondiente a un valor de fuerza conductora de electrones igual a cero (ecuación 6). Dado que la fuerza conductora de electrones es igual a cero cuando el potencial redox de la enzima y del sustrato es igual, de manera indirecta obtuvieron el potencial redox de la enzima (ecuación 7).

$$\ln k_{ET} = mE^{\circ}_S + b \quad (5)$$

$$E^{\circ}_S = \frac{\ln k_{ET} - b}{m} \quad (6)$$

Recordando que cuando $\Delta E = 0$ la $k_{ET} = 0.08k_{ET\ 4\text{-metoxifenol}}$

$$E_E \cong E_S = \frac{\{\ln[0.08(K_{ET\ 4\text{-Metoxifenol}})]\}^{-b}}{m} \quad (7)$$

Utilizando la ecuación 7 se obtuvieron los valores de potencial redox de las variantes evaluadas en este trabajo.

5.8. Generación y análisis de modelos estructurales de las variantes de citocromo c de *S. cerevisiae*

Partiendo del archivo 1YCC depositado en el PDB (The RCSB Protein Data Bank) por Louie y Brayer (1990), y la secuencia del citocromo c de *S. cerevisiae* se obtuvieron modelos estructurales, que se generaron incluyendo los cambios puntuales presentes en cada variante. A partir de la nueva secuencia se generó la estructura correspondiente con la ayuda del servidor en internet CPHmodels 2.0 Server (Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark). Estas estructuras no tenían modelado el grupo hemoprostético por lo que fue necesario integrarlo a las estructuras basándonos en las coordenadas reportadas para el grupo hemoprostético en 1YCC. Después se procedió a realizar un “annealing” o recocido sobre las estructuras modeladas, proceso en el que se simula que la proteína es sometida a energía cinética equivalente a una temperatura de 1000°C lo cual estimula todos los residuos propiciando su movimiento. Posteriormente, el efecto de la temperatura es eliminado y los residuos de la proteína se acomodan en la posición de menor energía o más estable, tal y como se encontrarían en el plegamiento normal de una proteína, con la finalidad de acomodar los residuos en su posición teóricamente más estable en la estructura.

Una vez realizado este proceso se refinó la posición de los residuos de manera manual, basándonos en el modelo (1YCC) descargado del PDB (WinCoot 0.1.2.), y se realizó la comparación de los modelos con la finalidad de elucidar posibles cambios en la estructura de la variante M2 que pudiesen ser relacionados con las diferencias en actividad y el potencial de oxido reducción. El volumen interno fue determinado con ayuda del servidor en internet CASTp (Dundas *et al.*, 2006) a partir de los modelos generados.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Modificación química del citocromo c de *S. cerevisiae*

Con la finalidad de determinar el efecto de la modificación química sobre el potencial redox en hemoproteínas, los grupos amino libres del citocromo c de *S. cerevisiae* fueron modificados químicamente con polietilenglicol (PM 5000 Da) activado con cloruro cianúrico de acuerdo con Gaertner y Puigserver (1992) y los grupos carboxilos libres, incluidos los propionatos del hemo fueron, metilados de acuerdo con Tinoco y Vazquez-Duhalt (1998).

En el 2002, García-Arellano y colaboradores realizaron la modificación química del citocromo c de corazón de caballo con polietilenglicol, mediante la misma técnica empleada en este trabajo. Encontraron que el 80% de las lisinas presentes en esta proteína fueron modificadas, con lo que obtuvieron un biocatalizador (Cyt-PEG₅₀₀₀) con un peso de 94.3 KDa, con solo el 13% de proteína. El citocromo c presenta 15 residuos de lisina, las cuales son susceptibles a la modificación química con PEG₅₀₀₀, por lo que basándonos en el porcentaje de modificación obtenido por García-Arellano y colaboradores en 2002, es posible que 12 de las 15 lisinas presentes en el citocromo c de levadura puedan estar modificadas.

Los propionatos del grupo hemoprostético fueron designados como blanco de la metilación, sin embargo, esta reacción no es sitio-específica, por lo que todos los grupos carboxilo libres en la proteína pueden ser modificados (Tinoco y Vazquez-Duhalt, 1998). En la figura 10, se muestran los espectros de absorbancia UV-Vis de los citocromos c nativo y PEG-Cyt-Met. Como se observa en esta figura, la banda Soret a 410 nm, correspondiente al grupo hemoprostético, sufrió un ligero desplazamiento como resultado de la modificación química. Tinoco y Vazquez-Duhalt (1998) reportaron que este desplazamiento está relacionado con un cambio en el ambiente del grupo hemoprostético. En la figura 11 se muestra la diferencia entre los espectros de absorbancia del citocromo nativo y la preparación química (PEG-Cyt-Met).

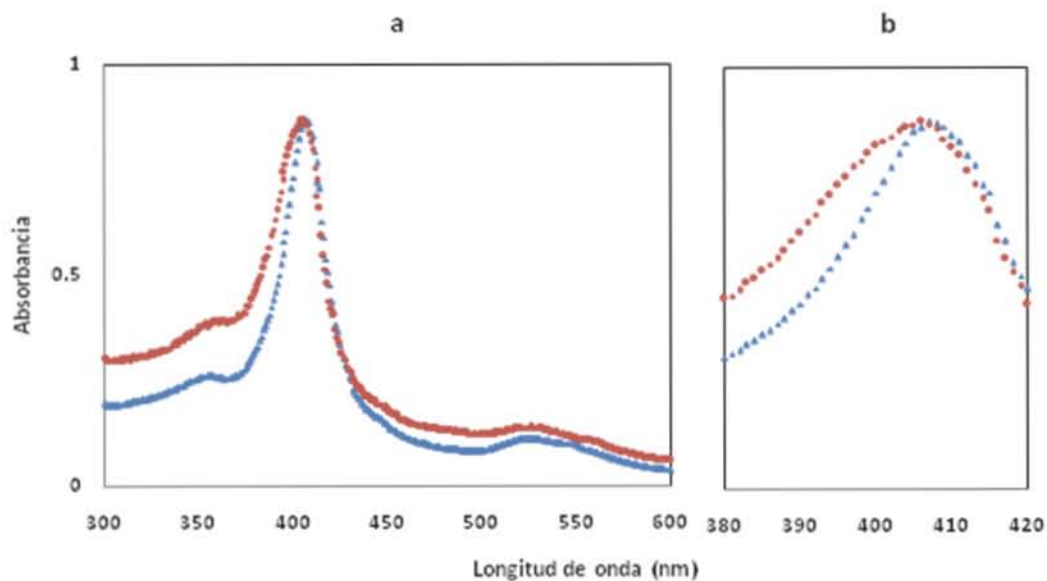


Figura 10. Espectro de absorbancia de 300-600 nm de los citocromos c de *S. cerevisiae* nativo (□ azul) y PEG-Cyt-MET (□ rojo) (a). Desplazamiento de la banda Soret a 410 nm (b).

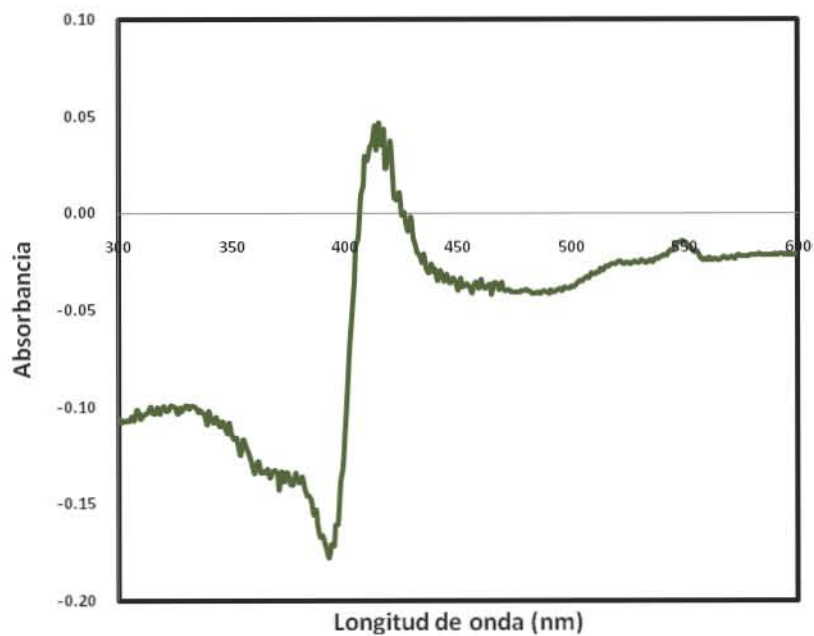


Figura 11. Diferencia entre los espectros de absorbancia de los citocromos c de *S. cerevisiae* nativo y PEG-Cyt-MET.

6.1.1. Efecto de las modificaciones químicas en la oxidación de guayacol

Como primera aproximación para detectar cambios en el comportamiento catalítico del citocromo c como efecto de la modificación química, la actividad tipo peroxidasa de la preparación química PEG-Cyt-MET, fue ensayada mediante espectrofotometría UV/Vis (Beckman DU 650) utilizando guayacol como sustrato. El valor de actividad específica se determinó midiendo la diferencia de absorbancia por minuto a 470 nm y utilizando un coeficiente de extinción molar correspondiente a la formación del tetraguayacol de $26.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Chance y Maehly 1955; DePillis *et al.*, 1997).

Se encontró que la preparación con PEG₅₀₀₀ y grupos metilo presentó un incremento en actividad de aproximadamente 10 veces con respecto a la proteína nativa (tabla 9). En diferentes trabajos se han utilizado hemoproteínas modificadas químicamente con polietilenglicol y grupos metilo. En el caso de la hemoglobina y el citocromo c de corazón de caballo, la modificación química, además de mejorar su estabilidad a la temperatura, pH y solventes orgánicos, logró aumentar el rango de sustratos y mejorar sus capacidades catalíticas en la oxidación de diferentes hidrocarburos aromáticos policíclicos, generando así biocatalizadores estables e interesantes para su uso ambiental (Tinoco y Vazquez-Duhalt, 1998; Torres y Vazquez-Duhalt, 2000; García-Arellano *et al.*, 2002).

Tabla 9. Actividad específica de los citocromos c nativo y de la preparación PEG-Cyt-MET en la oxidación de guayacol

Citocromo c	Actividad específica (min^{-1})
Citocromo c nativo	0.49 ± 0.02
PEG-Cyt-MET	4.87 ± 0.21

6.1.2. Efecto de las modificaciones químicas en la oxidación de fenoles

La actividad peroxidasa de la preparación PEG-Cyt-MET fue ensayada en la oxidación de 11 diferentes compuestos fenólicos *p*-sustituídos, los cuales presentaban potenciales redox entre 0.46-1.23 V. La disminución del área del pico de los diferentes sustratos, resultado de la actividad peroxidasa de la preparación, se cuantificó mediante HPLC (Perkin-Elmer 235C) utilizando una columna C18 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) en fase reversa y un detector de arreglo de diodos. Los resultados se enlistan en la tabla 10.

Tabla 10. Actividad específica de los citocromos c nativo y de la preparación PEG-Cyt-MET en la oxidación de fenoles *p*-sustituídos.

Compuesto	Clave	E° (Volts)	Actividad específica min ⁻¹	
			Citocromo c nativo	PEG-Cyt-MET
Hidroquinona	HQ	0.46	30.80 ±2.37	32.02 ±2.64
4-Metoxifenol	4MXF	0.72	22.40 ±1.07	18.24 ±0.33
4-Etoxifenol	4EXF	0.73	21.86 ±0.45	20.52 ±0.68
4-Etilfenol	4EF	0.87	12.81 ±1.33	13.41 ±0.26
4-metilfenol	4MF	0.87	10.02 ±1.05	14.62 ±1.44
4-Clorofenol	4ClF	0.94	5.45 ±0.51	8.40 ±0.10
4-Bromofenol	4BrF	0.96	7.10 ±0.05	8.37 ±0.48
Fenol	F	0.97	7.07 ±0.48	6.56 ±0.81
4-Hidroxiacetofenona	4HAF	0.98	1.65 ±0.04	3.97 ±0.59
4-Hidroxibenzonitrilo	4HBN	1.17	3.21 ±0.18	4.22 ±0.28
4-Nitrofenol	4NF	1.23	3.03 ±0.21	3.48 ±0.41

Como se observa en la tabla anterior, ambas proteínas presentaron actividad contra todos los compuestos ensayados. Se observaron ligeros incrementos en la actividad de la preparación PEG-Cyt-MET con 8 de los 11 sustratos ensayados, hidroquinona, 4-etilfenol, 4-clorofenol, 4-bromofenol, 4-hidroxiacetofenona, 4-hidroxibenzonitrilo y 4-nitrofenol. Sin embargo, estos incrementos no son importantes tomando en cuenta el valor de las desviaciones estándar, como se observa con mayor claridad en la figura 12.

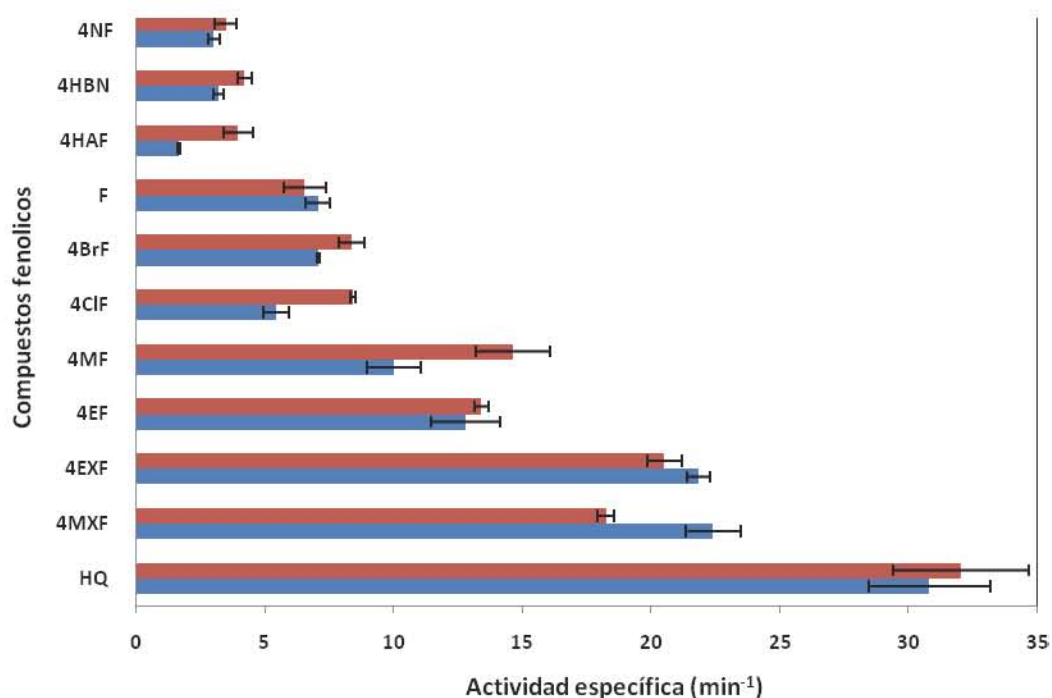


Figura 12. Perfiles de actividad de los citocromos c nativo (□) y PEG-Cyt-MET (□) en la oxidación de compuestos fenólicos.

Como ya se mencionó anteriormente, el efecto de las modificaciones químicas sobre la actividad peroxidasa de las hemoproteínas se favorece en reacciones con sustratos hidrofóbicos como en el caso de los HPAs y en altas concentraciones de solventes orgánicos (Tinoco y Vazquez-Duhalt, 1998; Torres y Vazquez-Duhalt, 2000).

De manera general, la actividad de ambas proteínas disminuyó conforme el potencial redox de los sustratos (E° s) fue en aumento (Fig. 13), presentando la mayor actividad con la hidroquinona, sustrato con el menor potencial redox y por lo tanto el más oxidable, mientras que la menor actividad se obtuvo con el 4-nitrofenol, el cual posee un potencial de 1.23 V, el más alto de los todos los sustratos ensayados.

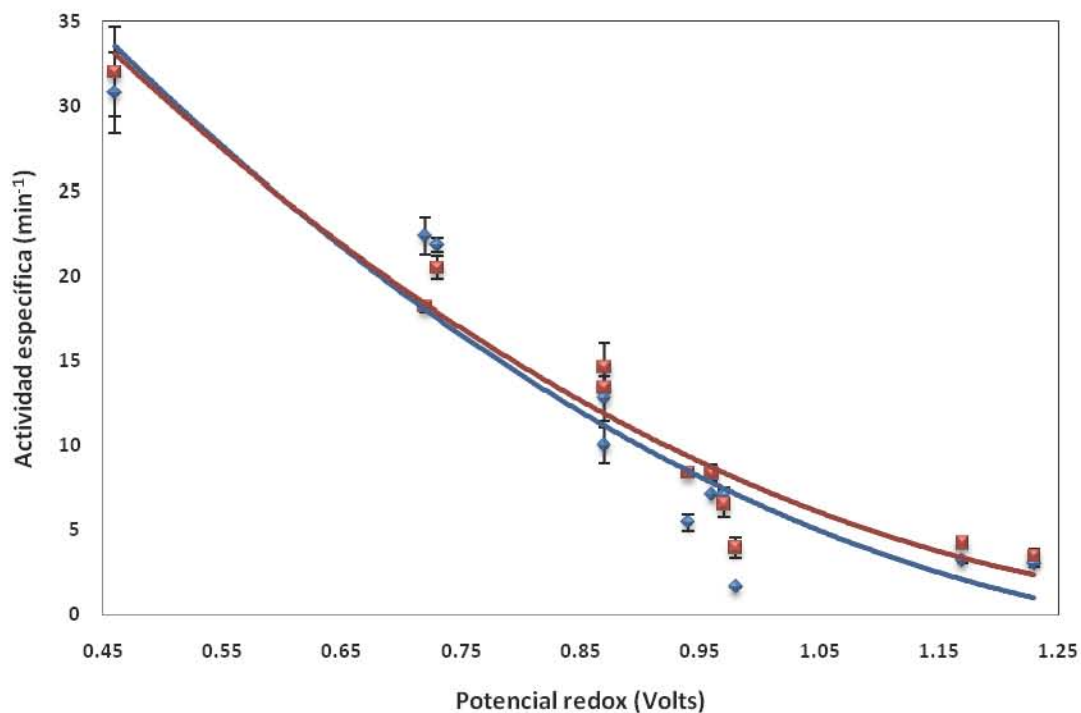


Figura 13. Efecto del potencial redox de los sustratos sobre la actividad de los citocromos c nativo (□) y PEG-Cyt-MET (□).

6.1.3. Estimación del potencial redox de la preparación PEG-Cyt-MET

Basándonos en un reciente reporte de Ayala *et al.* (2007), inspirado en la teoría de transferencia de electrones en la esfera exterior propuesta por Marcus y Sutin (1985), se determinó el potencial redox de la pareja compuesto II/Fe III en los citocromos c nativo y PEG-Cyt-MET, utilizando los valores de actividad específica determinados con los 11 compuestos fenólicos ensayados previamente.

Los valores del logaritmo natural de la actividad inicial específica en la oxidación de los compuestos fenólicos se graficaron contra su potencial redox, obteniéndose una correlación semilogarítmica entre estos valores. Esta correlación ha sido observada por diversos autores en el caso de óxido-reductasas como las lacasas y peroxidases (Folkes y Candeias, 1997; Fenoll *et al.*, 2005; Ayala *et al.*, 2007).

Este trabajo constituye la primera aproximación de este enfoque en citocromo c y proteínas modificadas químicamente. En la figura 14, se muestra la correlación entre el potencial redox de los sustratos y el logaritmo natural de la velocidad de transferencia de electrones para el citocromo c nativo. Como se observa en esta la figura, el valor de actividad en la oxidación de la 4-hidroxiacetofenona se sale de la correlación, lo que provocó que el valor de r^2 fuese de 0.733, este valor es aceptable dado de que se trata de datos obtenidos experimentalmente. En el reporte de Ayala *et al.* (2007) se obtienen correlaciones con valores de r^2 bastante cercanos a los obtenidos en este trabajo. Sin embargo, si eliminamos el valor de actividad en la oxidación de la 4-hidroxiacetofenona de la curva, el valor de r^2 se incrementa a 0.92. El potencial redox estimado por este método para el citocromo nativo fue de 1.30 V.

$$E_E \approx E_S = [\ln(0.08 * 22.40 \text{ min}^{-1}) - 5.530] / -3.724 = 1.30 \text{ V}$$

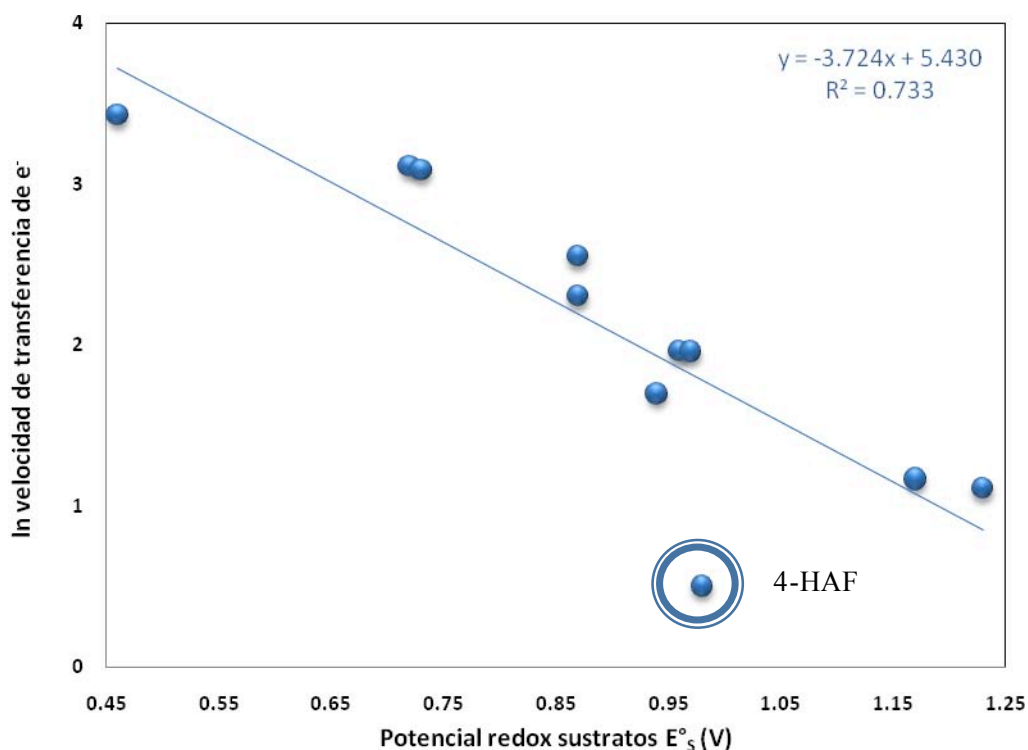


Figura 14. Correlación entre el potencial redox de los sustratos y el logaritmo natural de la velocidad de transferencia de electrones determinada para el citocromo c nativo con cada sustrato.

En la figura 15 se muestra la correlación entre el potencial redox de los sustratos y el logaritmo natural de la velocidad de transferencia de electrones obtenida para la preparación PEG-Cyt-MET. Como se observa en la figura 15 el valor de r^2 fue de 0.874, valor bastante confiable. Sin embargo, al eliminar el valor de actividad en la oxidación de la 4-hidroxiacetofenona de la curva el valor de r^2 se incrementa a 0.946. El potencial redox estimado por este método para la preparación de citocromo c fue de 1.494 V. Este valor es 194 mV mayor que el estimado para el citocromo c nativo, lo que resulta interesante debido a que demuestra que es posible incrementar el potencial redox de una hemoproteína mediante modificación química.

$$E_E \approx E_S = [\ln(0.08 \cdot 18.24 \text{ min}^{-1}) - 5.159] / -3.20 = 1.494 \text{ V}$$

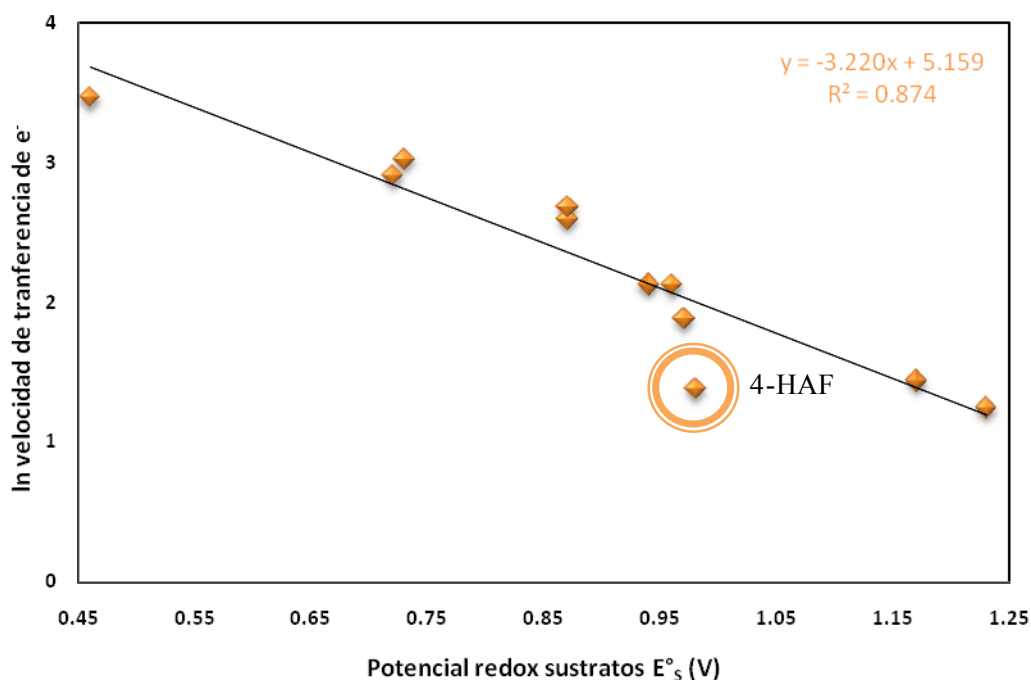


Figura 15. Correlación entre el potencial redox de los sustratos y el logaritmo natural de la velocidad de transferencia de electrones determinada para la preparación PEG-Cyt-MET con cada sustrato.

En el presente trabajo, los incrementos en la actividad de oxidación de fenoles no fueron muy importantes, posiblemente por la hidrofiliidad de estos compuestos. Sin embargo, Tinoco y Vazquez-Duhalt (1998) reportaron incrementos en la oxidación de HPAs (sustratos hidrofóbicos), con el uso de la preparación PEG-Cyt-MET, estos incrementos en actividad podrían relacionarse con el incremento en el potencial redox estimado en este trabajo.

En reportes anteriores se ha demostrado que la modificación química del citocromo c con PEG₅₀₀₀ y grupos metilo, rompe la sexta coordinación de grupo hemoprostético. Mediante estudios de esta preparación utilizando REP (Resonancia electroparamagnética) y espectroscopia UV/Vis, se demostró que el fierro del grupo hemoprostético se encontraba en un estado de alto espín, aumentando la capacidad catalítica de las preparaciones en la oxidación de sustratos hidrofóbicos (Busi *et al.*, 2000).

Debido a la alta reactividad de los compuestos I y II, es muy complicado determinar el potencial redox de las peroxidasas por técnicas convencionales, como la voltametría. Por lo cual, es común que se tome el valor del potencial redox de la pareja Fe II/Fe III, la cual no participa en su ciclo catalítico, como referente del poder oxidante de estas proteínas. En la tabla 11 se enlistan los valores de potencial redox reportados por diferentes autores para 5 diferentes peroxidasas y el citocromo c.

Tabla 11. Potenciales redox de diferentes peroxidasas medidos por voltametría y estimados por el enfoque basado en la teoría de Marcus y Sutin (1985). Modificada de Ayala *et al.*, 2007.

Hemoproteína	Potencial redox (Volts)	
	Fe II/Fe III	Compuesto II/Fe(III)
Citocromo c de <i>S. cerevisiae</i>	0.290 ^b	1.296±0.26 ^a
Peroxidasa versátil de <i>B. adusta</i>	0.050	1.37±0.19
Peroxidasa de <i>C. cinereus</i>	-0.183	1.18±0.15
Lactoperoxidasa bovina	-0.191	0.98±0.13
Peroxidasa de soya	-0.310	0.95±0.1
Peroxidasa de rábano blanco	-0.278	0.89±0.1

^a=Determinado en este trabajo; ^b=Lett y Guillemette, 2002.

En la figura 16 se muestra la correlación entre los datos reportados de potencial redox determinado de la pareja Fe II/Fe III y los valores determinados utilizando el enfoque de Marcus y Sutin para diferentes peroxidases y el citocromo c. Como se observa en esta figura, la correlación entre el potencial redox determinado por voltametría, pareja Fe II/Fe III, y la estimada con base en la actividad con los compuestos fenólicos, pareja compuesto II/Fe III, fue de 0.689. Sin embargo, como se observa en esta figura, la tendencia se conserva, utilizando la ecuación obtenida de la regresión lineal se calculó el potencial redox del citocromo c, obteniéndose un valor de 1.393 V. El valor obtenido en este trabajo para el citocromo c fue de 1.3 V, existiendo un diferencia del 6.7 % entre el valor calculado del gráfico y el obtenido por el enfoque de Marcus y Sutin (1985). Lo que nos habla de la confiabilidad de nuestros resultados y la relación entre los datos de voltametría para la pareja Fe II/Fe III y los estimados para la pareja compuesto II/Fe II.

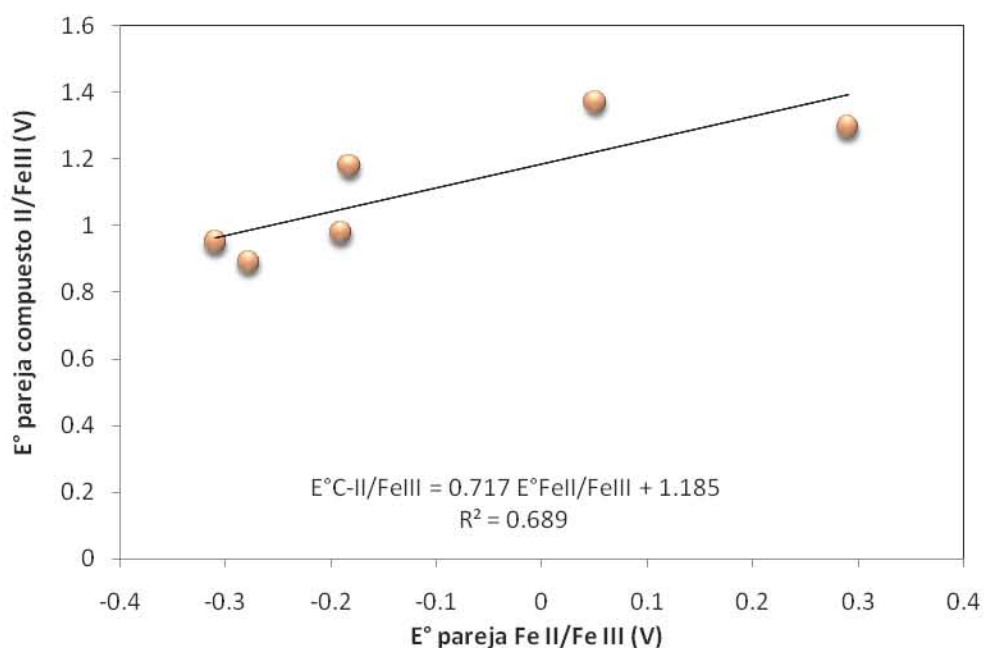


Figura 16. Correlación entre el potencial redox de la pareja Fe II/Fe III determinado por voltametría y los valores de potencial redox estimados con base en la actividad con compuestos fenólicos.

6.2. Análisis de variantes de citocromo c de *S. cerevisiae*

Con la finalidad de identificar variantes genéticas que presentaran comportamientos catalíticos mejorados, se evaluó un conjunto de 8 variantes genéticas (tabla 7), pertenecientes a la colección de variantes de citocromo c del laboratorio de biocatálisis ambiental del IBT-UNAM.

Estas variantes fueron seleccionadas para su ensayo debido a que presentaban mutaciones puntales en residuos con interacciones con el grupo hemoprostético, cercanía al acceso a la cavidad hemoprostética y grupos funcionales susceptibles al ataque del hierro del grupo hemo. En la figura 17 se observa la disposición de estos residuos en la estructura del citocromo c.

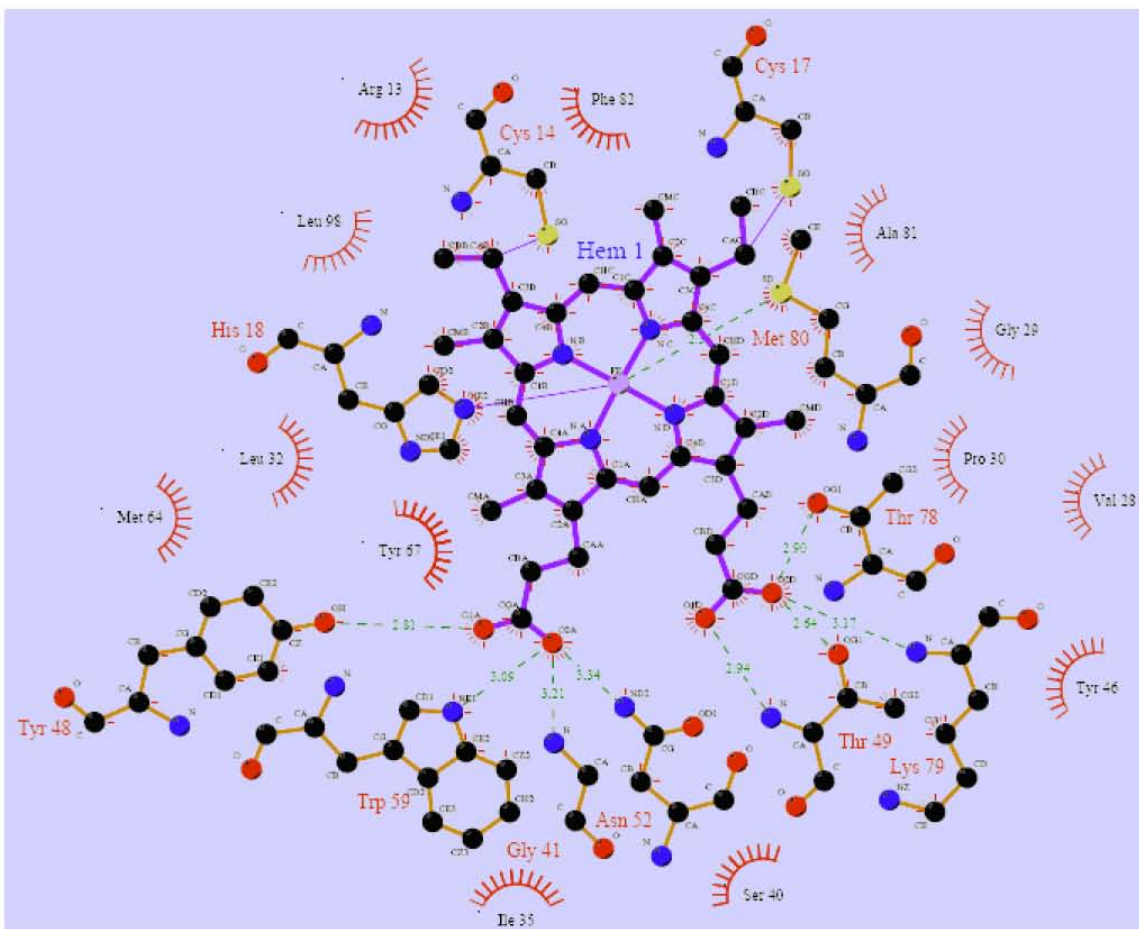


Figura 17. Posiciones e interacciones de los diferentes aminoácidos cercanos al grupo hemoprostético en citocromo c de *S. cerevisiae*. □ Carbono, □ Nitrógeno, □ Oxígeno, □ Azufre, □ Hierro y ☺ Cercanía de los residuos (sin interacción).

6.2.1. Selección de variantes con actividades mejoradas

El guayacol (2-metoxifenol) es un compuesto ampliamente utilizado como sustrato en ensayos colorimétricos con la finalidad de detectar actividades enzimáticas tipo peroxidasa. La oxidación del guayacol por parte de las peroxidasas en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) genera un cambio de coloración en la solución de reacción ocasionado por la formación del tetraguayacol, producto de la reacción, el cual es cuantificado espectrofotométricamente a 470 nm (Chance y Maehly, 1955; DePillis *et al.*, 1997).

El citocromo c no presenta una actividad muy importante en la oxidación del guayacol, por lo que se decidió utilizar este sustrato con la finalidad de encontrar cambios interesantes en la actividad de las diferentes variantes de citocromo c estudiadas. Las condiciones de reacción fueron las mismas que en los ensayos con el citocromo c nativo y la preparación PEG-Cyt-MET. Como resultado de los ensayos se encontró que de las 8 variantes genéticas de citocromo c, 7 presentaron mayor actividad en la oxidación de guayacol con respecto a la proteína nativa (WT16, M2, M3, M4, M5, M6, M7) (tabla 12 y figura 18).

Tabla 12. Actividades específicas de las diferentes variantes de Citocromo c en la oxidación de guayacol.

Variante de citocromo c	Actividad específica (min^{-1})	Act. Cyt. mutante / Act. Cyt. nativo
Citocromo M2	37.20 ± 2.49	75.92
Citocromo WT16	4.81 ± 0.13	9.82
Citocromo M7	4.78 ± 0.24	9.76
Citocromo M4	4.08 ± 0.51	8.33
Citocromo M6	3.26 ± 0.41	6.65
Citocromo M5	1.29 ± 0.05	2.63
Citocromo M3	1.08 ± 0.06	2.20
Citocromo c (nativo)	0.49 ± 0.02	1.00
Citocromo M1	0.17 ± 0.02	0.35

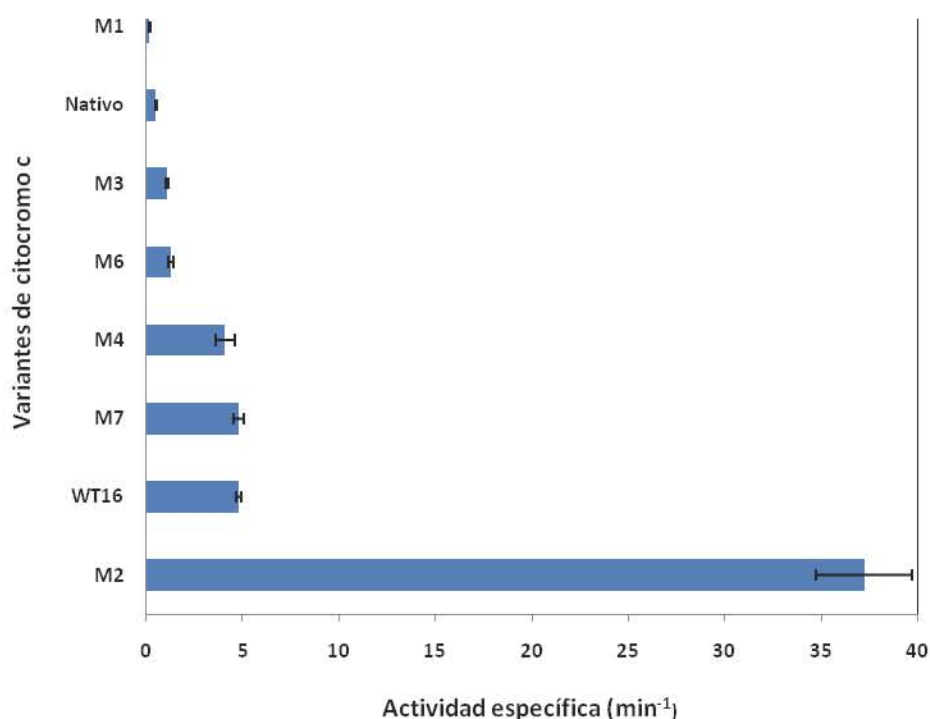


Figura 18. Actividades específicas de las diferentes variantes de citocromo c en la oxidación de guayacol.

La variante M1 presentó la menor actividad, $0.17 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$, mientras que la variante con la mayor actividad fue la mutante M2, presentando una actividad específica de $35.20 \pm 1.99 \text{ min}^{-1}$, la cual es 75 veces mayor que la determinada para la proteína nativa ($0.49 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$). Como se observa en la figura 18, las variantes WT16, M4 y M7 presentan actividades similares entre sí, 4.81 ± 0.13 , 4.08 ± 0.51 y $4.78 \pm 0.24 \text{ min}^{-1}$ respectivamente, y son en promedio 8.3 veces mayores que la encontrada con la proteína nativa.

Estas variantes tienen entre 2 y 7 mutaciones puntuales; la variante WT16 presenta dos mutaciones puntuales, la primera es un cambio en la treonina -5 por alanina (extremo N-terminal) y el segundo un cambio en la cisteína 102 por treonina (extremo C-terminal). Estos cambios son comunes en todas las variantes genéticas. En trabajos de mutantes de citocromo c, la variante WT16 generalmente es tomada como proteína nativa (Valderrama *et al.*, 2006), sin embargo en este trabajo la actividad de esta variante fue 9 veces mayor que la del citocromo c nativo.

La variante M4 presenta 4 mutaciones puntuales adicionales a las presentes en WT16; el residuo asparagina 52 fue cambiado por isoleucina, el residuo triptófano 59 fue cambiado por fenilalanina, el residuo tirosina 67 fue cambiado por fenilalanina y el residuo metionina 80 fue cambiado por isoleucina. El incremento en la actividad de esta mutante podría estar relacionado con el cambio en el residuo metionina 80 ya que este residuo forma la sexta coordinación de la molécula de hierro del grupo hemo. Al eliminar la coordinación se puede favorecer la actividad, debido a que al inicio del ciclo catalítico del citocromo c el peróxido de hidrogeno interacciona con la molécula de hierro del grupo hemo eliminando esta coordinación. Zhong-Hua y colaboradores 2007, reportaron un incremento de aproximadamente 7.8 veces en la actividad del citocromo c en la oxidación de guayacol cuando el residuo de metionina 80 fue mutado por valina. La actividad de la variante M4 fue 8.3 mayor que la encontrada con la proteína nativa.

La variante M7 contenía 7 mutaciones puntuales T-5A, N52I, W59F, Y67F y C102T, presentes en M4, además del cambio en el residuo K79 por treonina. En 2002, García-Arellano y colaboradores reportaron que variantes que contenían las siguientes mutaciones puntuales T-5A/Y67F/K79A/C102T y T-5A/Y67F/K79T/C102T fueron 3.2 y 2.08 veces más activas en la oxidación de pireno. Este sustrato hidrofóbico es más difícil de oxidar que el guayacol. Este reporte nos indica que el cambio del residuo K79, el cual se encuentra en el acceso de la cavidad del grupo hemo, favorece la actividad de esta proteína en la oxidación de pireno.

Como ya se mencionó anteriormente, la variante M2 (T-5A/N52I/Y67F/M80A/C102T), presentó la mayor actividad en la oxidación de guayacol. Al igual que la variante M4 presenta un cambio en el residuo M80, eliminando la sexta coordinación del hierro del grupo hemoprostético. Esto nos indica que la eliminación de la sexta coordinación favorece la actividad como en M4, pero además el aumento en la actividad puede estar relacionado con el tamaño del residuo insertado, debido a que en la variante M2 el cambio en M80 es por alanina y en la variante M4 es por isoleucina (residuo de mayor tamaño). El incremento en la actividad presentado en esta variante podría estar relacionado con un aumento en el volumen de la cavidad hemoprostética, con una mayor área en el acceso de solventes y sustratos o con un aumento en el potencial redox de la proteína.

6.2.2. Actividad de la variante M2, para la oxidación de compuestos fenólicos

Se determinó la actividad catalítica de la variante M2 contra diferentes sustratos fenólicos *p*-sustituídos, y con potenciales redox entre 0.46 y 1.23 Volts. Las condiciones de ensayo fueron las mismas utilizadas para los ensayos con la proteína nativa y la preparación PEG-Cyt-MET. Esta variante no presentó cambios en el número de sustratos. Al igual que el citocromo c y la preparación química, la variante M2 fue capaz de oxidar los 11 compuestos fenólicos ensayados. Al comparar los valores de actividad de la variante M2 con obtenidos en este trabajo para la proteína nativa y la preparación química PEG-Cyt-MET, se observa que la variante M2 presentó mayor actividad (tabla 13 y figura 19). Al igual que con la proteína nativa y la preparación química, la actividad de la variante disminuyó a medida que el potencial redox de los sustratos aumentó.

Tabla 13. Actividades específicas de los citocromos c nativo, PEG-Cyt-MET y M2 en la oxidación de compuestos fenólicos.

Compuestos	E°(Volts)	Clave	Actividad Específica en min ⁻¹		
			Citocromo c nativo ^a	PEG-Cyt-MET ^a	Variante M2
Hidroquinona	0.46	HQ	30.80 ±2.37	32.02 ±2.64	145.91±15.02
4-Metoxifenol	0.72	4MXF	22.40 ±1.07	18.24 ±0.33	69.76±3.55
4-Etoxifenol	0.73	4EXF	21.86 ±0.45	20.52 ±0.68	67.68±6.18
4-Etilfenol	0.87	4EF	12.81 ±1.33	13.41 ±0.26	46.31±3.88
4-metilfenol	0.87	4MF	10.02 ±1.05	14.62 ±1.44	32.14±0.00
4-Clorofenol	0.94	4ClF	5.45 ±0.51	8.40 ±0.10	14.40±1.36
4-Bromofenol	0.96	4BrF	7.10 ±0.05	8.37 ±0.48	25.09±0.25
Fenol	0.97	F	7.07 ±0.48	6.56 ±0.81	15.44±2.08
4-Hidroxiacetofenona	0.98	4HAF	1.65 ±0.04	3.97 ±0.59	2.62±0.33
4-Hidroxibenzonitrilo	1.17	4HBN	3.21 ±0.18	4.22 ±0.28	13.19±1.80
4-Nitrofenol	1.23	4NF	3.03 ±0.21	3.48 ±0.41	7.15±0.97

^a = Resultados tomados de la tabla 10.

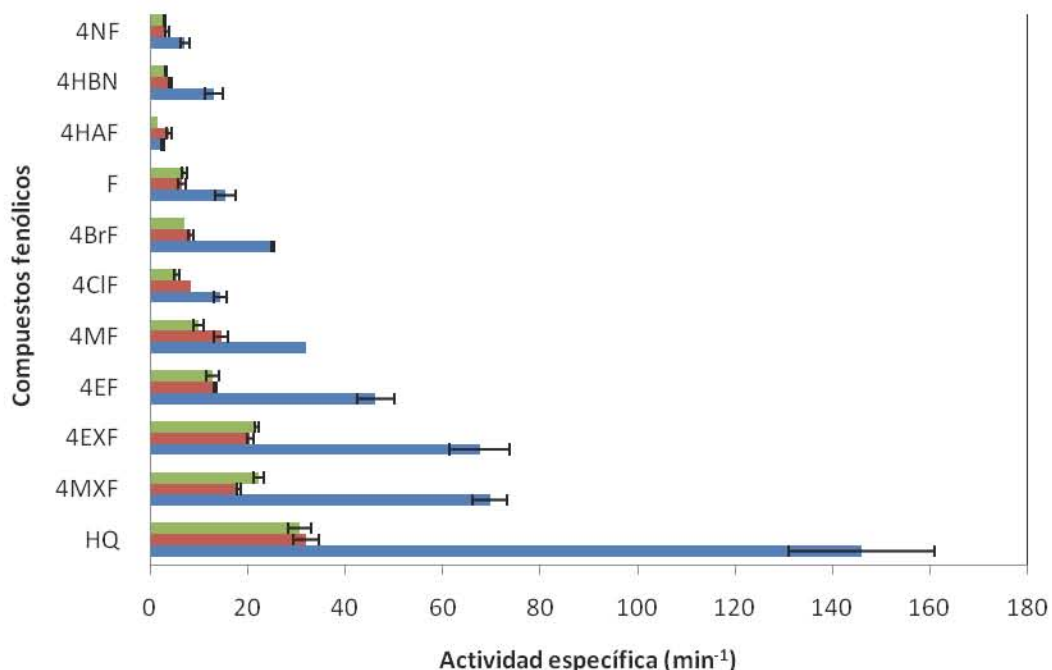


Figura 19. Actividades específicas de los diferentes citocromos c en la oxidación de fenoles. Citocromo nativo (■), PEG-Cyt-MET (■) y variante M2 (■).

En los ensayos con la variante M2 y los compuestos fenólicos, el mayor valor de actividad, $145.91 \pm 15.02 \text{ min}^{-1}$, se encontró en los ensayos con hidroquinona, lo cual no fue sorprendente debido a que el potencial de oxidación de este sustrato fue el menor de los ensayados, 0.46 V. El valor fue 4.74 veces mayor que el encontrado con la proteína nativa en los ensayos con el mismo sustrato.

De los compuestos ensayados, el de mayor potencial redox es el 4-nitrofenol (1.23 V), por lo que se esperaba que este compuesto presentara los valores de actividad más bajos con todas las proteínas. Sin embargo, el menor valor de actividad ($2.62 \pm 0.33 \text{ min}^{-1}$) para la variante M2 se presentó en la reacción con 4-hidroxiacetofenona. Este efecto se observa con la proteína nativa y en menor grado con la preparación PEG-Cyt-MET, obteniéndose valores de actividad de 1.65 ± 0.04 y $3.97 \pm 0.59 \text{ min}^{-1}$ respectivamente. En la figura 20 se muestran las estructuras de la 4-hidroxiacetofenona y el 4-nitrofenol.



Figura 20. Estructuras de los compuestos 4-hidroxiacetofenona y 4-nitrofenol. □ Carbono, ● Oxígeno, ● Nitrógeno e ● Hidrógeno.

La 4-hidroxiacetofenona presenta el segundo volumen molecular (136.65 \AA^3) de los compuestos fenólicos utilizados, sólo después del 4-etoxifenol (138.15 \AA^3), por lo que podría difundirse a la cavidad hemoprostética con una menor velocidad que la mayoría de los sustratos ensayados, influyendo en velocidad de oxidación. Se calculó el valor de $\log P_{\text{octanol/agua}}$, medida de hidrofobicidad de los sustratos (tabla 8), con la finalidad de relacionar este parámetro con la actividad. Sin embargo, como se observa en la tabla 8, el valor de $\log P_{\text{octanol/agua}}$ es intermedio entre los sustratos ensayados. Es posible que la combinación de los efectos del volumen molecular y la hidrofobicidad, aunado al potencial redox de la 4-hidroxiacetofenona, sea responsable de que con éste compuesto se presente la menor velocidad de oxidación con el citocromo nativo y la variante M2.

6.2.3. Estimación del potencial redox de la variante M2

Al igual que con el citocromo c nativo y la preparación química, el potencial redox de la pareja compuesto II/Fe III en la variante M2 fue estimado con base en el reporte de Ayala y colaboradores (2007), utilizando los valores de actividad específica determinados con los 11 compuestos fenólicos ensayados previamente. En la figura 21 se muestra la correlación entre el potencial redox de los sustratos y el logaritmo natural de la velocidad de transferencia de electrones para la variante M2.

$$E_E \approx E_S = [\ln(0.08 \cdot 69.76 \text{ min}^{-1}) - 7.083] / -4.347 = 1.234 \text{ V}$$

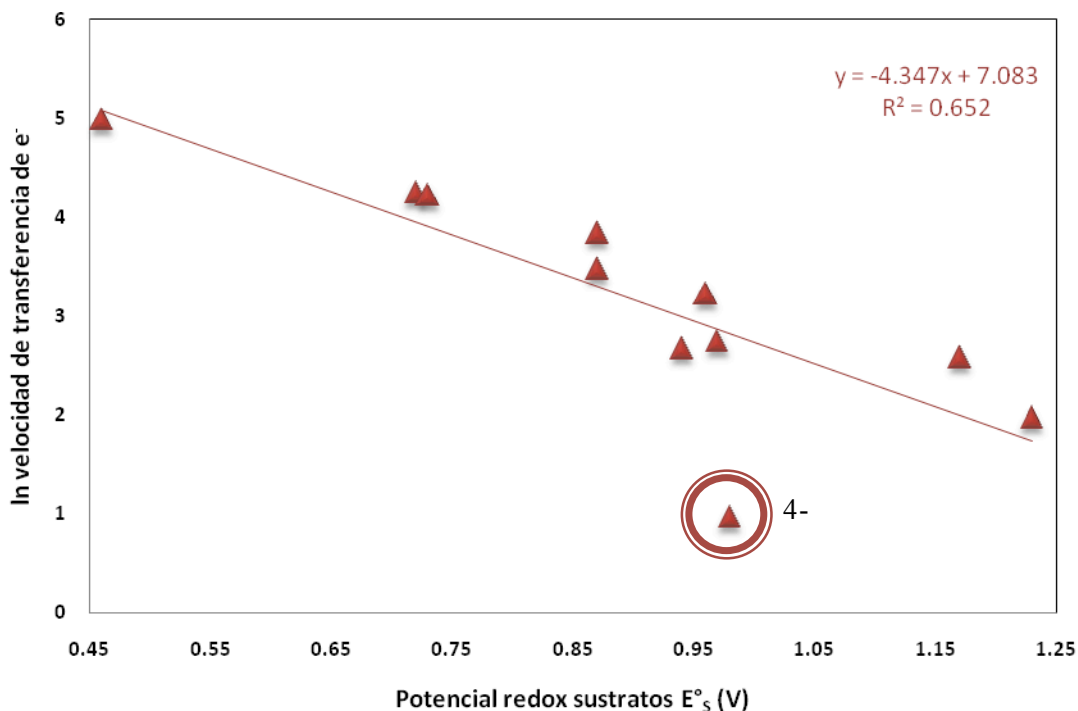


Figura 21. Correlación entre el potencial redox de los sustratos y el logaritmo natural de la velocidad de transferencia de electrones determinada para el citocromo c variante M2 con cada sustrato.

Como se observa en la figura anterior, al igual que con el citocromo c nativo, el valor de actividad en la oxidación de la 4-hidroxiacetofenona se sale de la correlación, lo que provocó que el valor de r^2 fuese de 0.652. Al eliminar el valor de actividad en la oxidación de la 4-hidroxiacetofenona de la curva el valor de r^2 se incrementa a 0.908.

El valor del potencial redox de la pareja compuesto II/Fe III estimado para el citocromo c nativo fue 1.30 V, mientras que el de la variante M2 fue 1.234 V (0.066 V menor). Este resultado nos condujo a descartar que el incremento en la actividad se debía a un aumento en el potencial redox de la variante M2. Diferentes autores han reportado cambios en el potencial redox de variantes con mutaciones puntuales; sin embargo, en la mayoría de los casos el potencial redox disminuye por efecto de estos cambios (Thurgood *et al.*, 1991; Berghuis *et al.*, 1994; Lett y Guillemette, 2002).

En el trabajo publicado por Lett y Guillemete (2002) se utilizaron diferentes variantes de citocromo c, las cuales fueron sujetas a mutación sitio-dirigida con la finalidad de aumentar su potencial redox. De todas las proteínas estudiadas solo una variante, la cual presentaba un cambio en la tirosina 48 por lisina, aumentó su potencial redox. Mientras que en dos mutantes que presentaban cambios puntuales en los residuos N52 y Y67 disminuyeron su potencial redox, estos cambios se encuentran en la variante M2, y podrían ser los responsables de la disminución en el potencial redox de la variante M2. No existen reportes de mediciones del potencial redox en variantes que presenten mutaciones en M80, por lo que el efecto del cambio de este residuo por alanina sobre el potencial redox es difícil de establecer.

6.3. Análisis de modelos estructurales de los citocromos c nativo y M2

Dado que el aumento en la actividad presentado por la variante M2 no se correlacionó con un cambio en el potencial redox, nos dimos a la tarea de evaluar efectos estructurales que pudiesen influenciar la actividad de esta proteína. Como etapa inicial de este análisis, se generaron modelos estructurales de las diferentes variantes de citocromo c estudiadas en este trabajo, con la finalidad de comparar, entender y visualizar cambios estructurales en la estructura proteica que nos permitieran encontrar una explicación a las diferencias de actividad entre la proteína nativa y las variantes.

Los modelos estructurales de las variantes se generaron utilizando como templatado la estructura cristalográfica del citocromo c (código 1YCC, depositado en el RCSB Protein Data Bank) (Louie y Brayer, 1990). En la secuencia del citocromo c de *S. cerevisiae* se incluyeron los cambios puntuales presentes en cada variante y, a partir de la nueva secuencia, se generó la estructura correspondiente con la ayuda del servidor en internet CPHmodels 2.0 Server (Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark).

Los modelos obtenidos fueron optimizados mediante un “annealing”, recocido, proceso en que se simula que la proteína es sometida a la adición de una energía cinética equivalente a una temperatura de 1000°C, restringiendo el movimiento de la cadena principal y favoreciendo al de las cadenas laterales de todos los residuos. Después el efecto energético se minimiza y los residuos de la proteína se reacomodan en la posición más estable, tal y como se encontrarían en el plegamiento normal de una proteína.

Con la finalidad de establecer la fidelidad de los modelos con respecto a los datos del archivo 1YCC (Louie y Brayer, 1990), obtenido del PDB y que sirvió de templado para el modelado de las estructuras de las proteínas analizadas, se realizó un empalme estructural entre la estructura 1YCC del PDB y el modelo correspondiente al citocromo c nativo generado. Como se observa en la figura 22, el modelo estructural del citocromo c generado presenta una alta similitud con los obtenidos con los datos de cristalografía de rayos-X, lo que nos permite indicar que los datos obtenidos de la comparación de los modelos estructurales serán confiables, dentro de las limitaciones del uso de un modelo teórico.

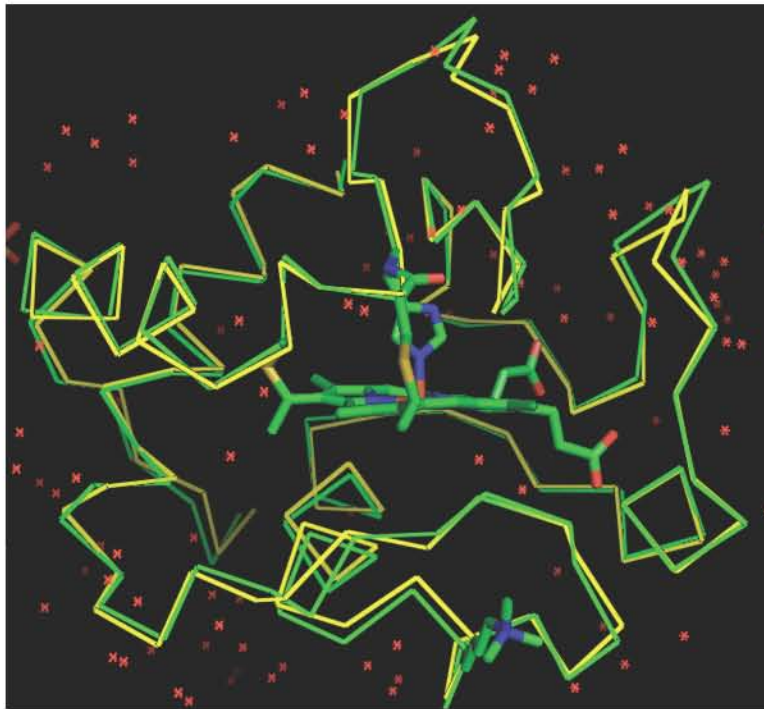


Figura 22. Empalme estructural entre el modelo del archivo de PDB 1YCC (verde) y el modelo obtenido para la proteína nativa (amarillo). Moléculas de agua del solvente (*).

Se realizó el empalme estructural entre los modelos de la proteína nativa y la variante M2, con la finalidad de evaluar el efecto individual de cada mutación sobre la conformación de la proteína y/o el grupo hemoprostético.

La primera mutación analizada fue el cambio de la treonina -5 por alanina, este cambio se presenta como un error en la secuencia del gen iso-1-citocromo c, del cual se partió para obtener las variantes. No existen reportes en la literatura que hayan determinado el efecto de este cambio puntual sobre la actividad de las proteínas. Como se observa en la figura 23, el empalme estructural realizado muestra que el cambio T-5A afecta la organización estructural del extremo amino terminal de la variante M2.

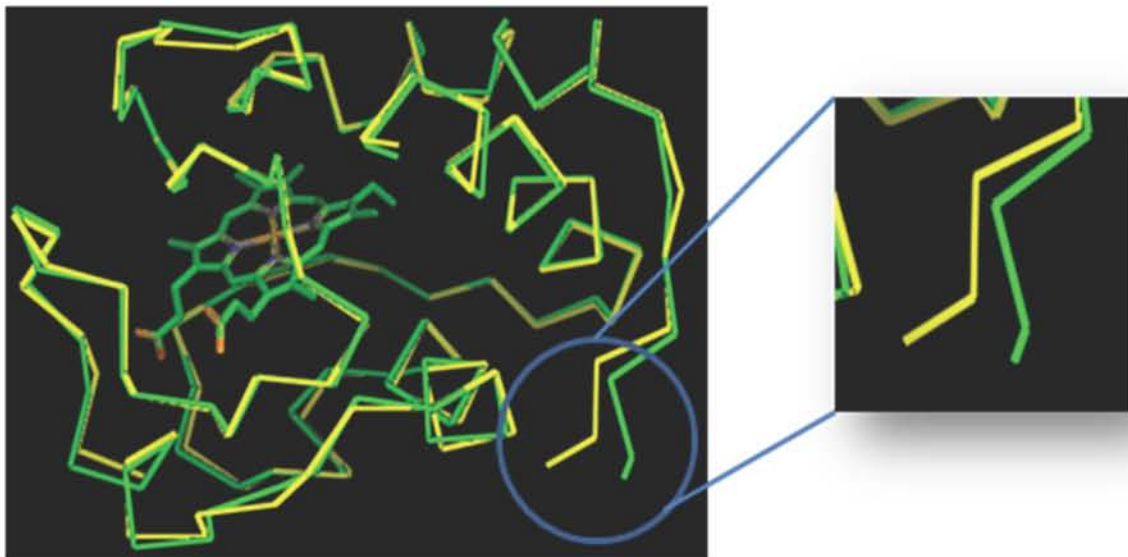


Figura 23. Empalme estructural de los citocromos c nativo y M2 presentando el cambio en la región amino terminal de la cadena principal ocasionado por la mutación de la treonina -5 por alanina.

El efecto de la mutación T-5A sobre la región N-terminal se ha observado en todas las estructuras cristalográficas de variantes de citocromo c a partir del gen iso-1-citocromo c depositadas en el PDB, en especial la estructura del iso-1-citocromo c 1YIC (Banci *et al.*, 1997), resuelto por RMN, muestra que este extremo presenta una gran movilidad (fig. 24).

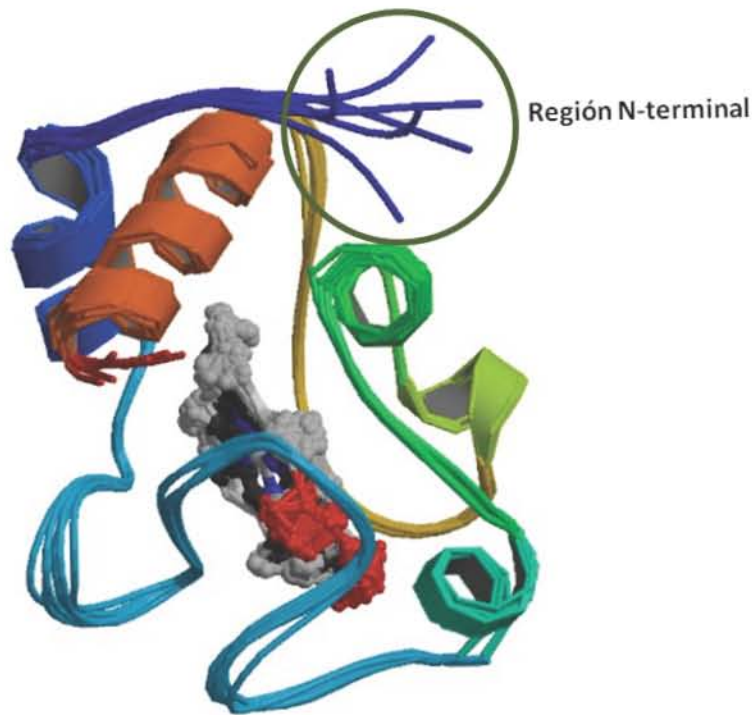


Figura 24. Estructura del iso-1-citocromo c resuelto por RMN (Banci *et al.*, 1997), presentando en azul la gran variabilidad estructural del extremo amino terminal de la cadena principal de esta proteína.

El efecto de la mutación en residuo asparagina 52 por isoleucina en la variante M2 se presenta en la figura 25b, como se observa en esta figura el cambio del residuo de asparagina 52 por isoleucina rompe una interacción entre la molécula de agua 166, uno de los propionatos del grupo hemo prostético y el grupo amino de asparagina 52. Berghuis y colaboradores (1994), observaron este efecto en variantes de citocromo c de *S. cerevisiae*, las cuales presentaban la mutación del residuo asparagina 52 por isoleucina. En este reporte se sugiere que el residuo de asparagina 52 es importante en la modulación de los cambios entre los estados de oxidación del propionato del grupo pirrólico, por lo cual las variantes con mutantes del residuo 52 no presentan distorsiones en el propionato A ni en estado reducido ni oxidado.

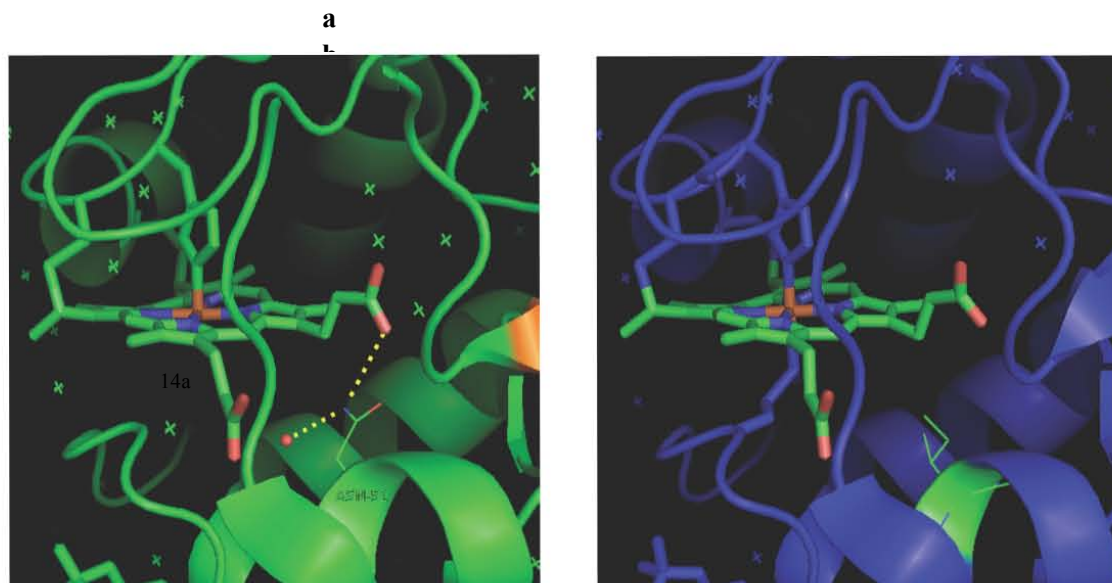


Figura 25. Efecto de la mutación N52I en el citocromo c. En la figura 25a se presenta la interacción por puente de hidrógeno entre un amino del residuo asparagina 52 y el propionato del anillo hemo pirrólico A del grupo hemoprostético y la molécula de agua 166 en el citocromo nativo. En la figura 25b se presenta el modelo de la variante M2 en el que se observa la pérdida de estas interacciones.

La molécula de agua 166 es excluida de la conformación estructural como efecto de la mutación en la asparagina 52, lo que aumenta la flexibilidad de la proteína. El potencial redox de una variante que presentaba las mutaciones N52I y Y67F fue medido (Berghuis *et al.*, 1994), encontrándose que esta variante presentaba una disminución de 0.056 V en su potencial redox respecto al de la proteína nativa, lo cual correlaciona con los resultados obtenidos para la estimación del potencial redox realizada en este trabajo en donde la variante M2 presenta un potencial redox 0.066 V menor al de la proteína nativa. Esta disminución en el potencial redox fue atribuida a la ruptura de un puente de hidrógeno entre la tirosina 67 y la metionina 80, así como a la formación de un nuevo puente de hidrógeno entre la tirosina 67 y treonina 78. En la figura 26 se observa el residuo de tirosina 67, el cual se encuentra muy cercano al grupo hemoprostético. La tirosina posee un grupo hidroxilo el cual podría ser susceptible al ataque del grupo hemoprostético. Este residuo mantiene interacciones con diferentes aminoácidos, como la treonina 78 y la metionina 80, y moléculas de agua como la 166 dentro de la estructura del citocromo c, por lo que este residuo es de gran importancia para la estabilidad de la proteína.

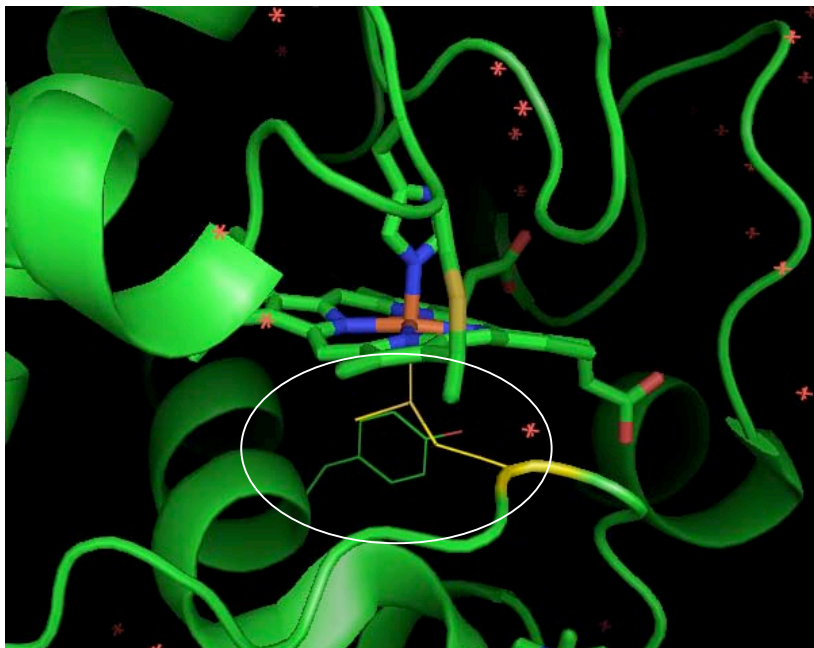


Figura 26. Posición del residuo tirosina 67 en la cavidad del grupo hemoprostético. En el extremo del óvalo se observa la molécula de agua interna 166. (* Moléculas de agua).

El residuo tirosina 67 fue sujeto a una mutación puntual por fenilalanina en la variante M2, como se observa en la figura 27. Se propone, como en el caso de la asparagina 52, que la mutación de la tirosina 67 por fenilalanina afecta a la molécula de agua 166, la cual juega el papel de modular cambios conformacionales dependientes del estado de oxidación en la proteína (Berghuis y Brayer, 1992). Mediciones del potencial redox de la variante Y67F, reportan una disminución de 0.056 V, con respecto a la proteína nativa. Esta disminución fue atribuida al posible aumento en la hidrofobicidad de la cavidad del grupo hemoprostético (Berghuis *et al.*, 1994). En diferentes trabajos se reporta que la mutación de la tirosina 67 por fenilalanina aumenta la estabilidad de la proteína en su estado oxidado (Luntz *et al.*, 1989; Wallace *et al.*, 1989; Schejter *et al.*, 1992).

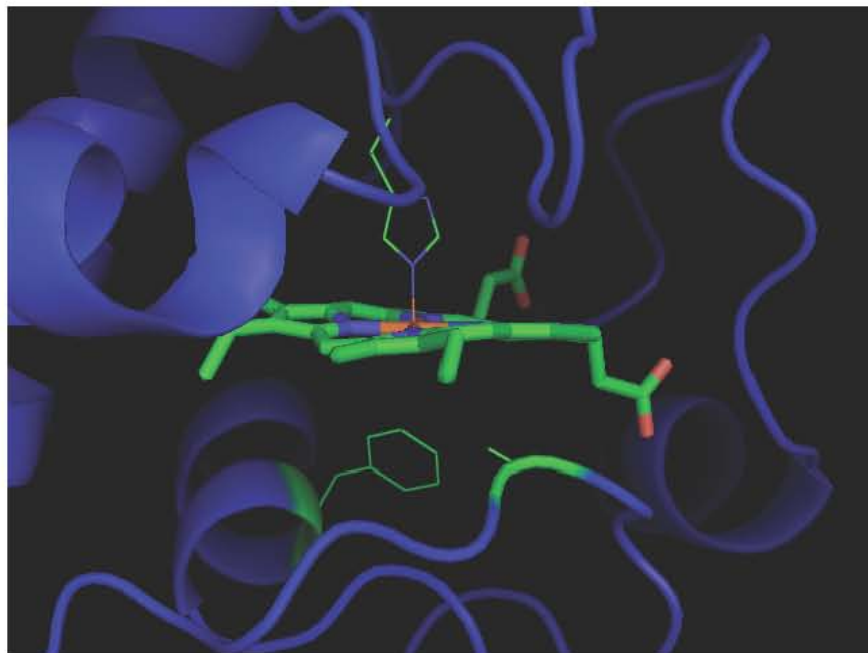


Figura 27. Posición de los residuos fenilalanina 67 y alanina 80 presentes en la variante M2.

El cambio del residuo metionina 80 por alanina en la variante M2 elimina la sexta coordinación de la molécula de hierro del grupo hemoprostético (figura 28). Esta sexta coordinación se rompe en presencia del peróxido de hidrógeno para dar paso al ciclo catalítico del citocromo c en la oxidación de diferentes sustratos. Como se observa en la figura 29, el espacio en la cavidad del grupo hemoprostético es mayor, lo que podría facilitar la entrada de solvente y de los sustratos a oxidar. Este aumento en el espacio interno de la cavidad hemoprostética puede ser un factor determinante para explicar el aumento de 75 veces en la actividad de la variante M2 en la oxidación de guayacol, ya que cabe la posibilidad de que mayor número de moléculas de sustrato entren a la cavidad hemoprostética por unidad de tiempo, optimizando el ciclo catalítico. Basándonos en los resultados obtenidos en la oxidación de guayacol, la mutación puntual del metionina 80 por alanina, es fundamental para el aumento de la actividad, debido a que los residuos asparagina 52 y tirosina 67 no influyen en el aumento de actividad, ya que la variante M1, que tenía estos cambios puntales, reportó la menor actividad de todas. Sin embargo, el aumento no solo debe ser atribuido a la eliminación de la sexta coordinación, sino que también al espacio generado en la cavidad.

Como se observa en los ensayos con guayacol, el cambio en el residuo M80 por isoleucina no presenta un incremento tan marcado en la actividad, posiblemente como consecuencia del mayor tamaño de este residuo con respecto a la alanina.

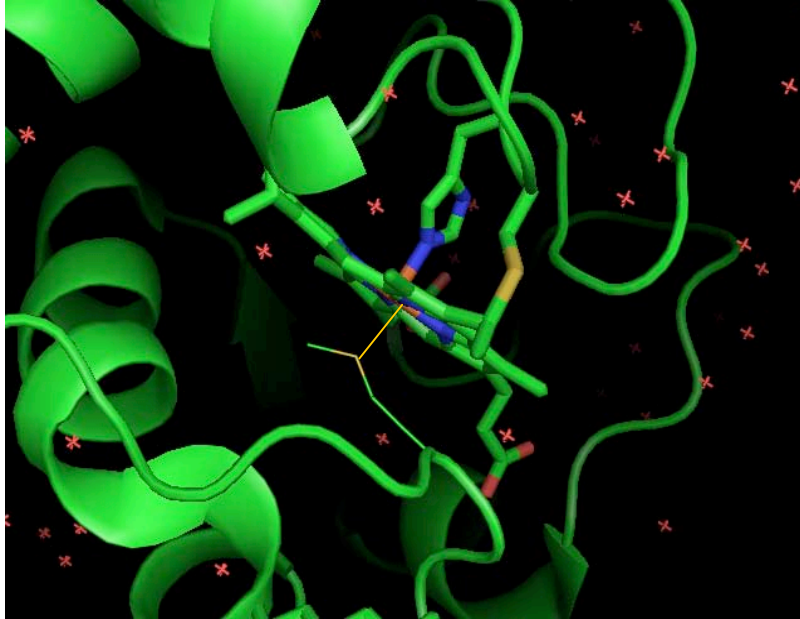


Figura 28. Cavity del grupo hemoprostético del citocromo c de *Saccharomyces cerevisiae*, mostrando la metionina 80, sexta coordinación de la molécula de hierro.

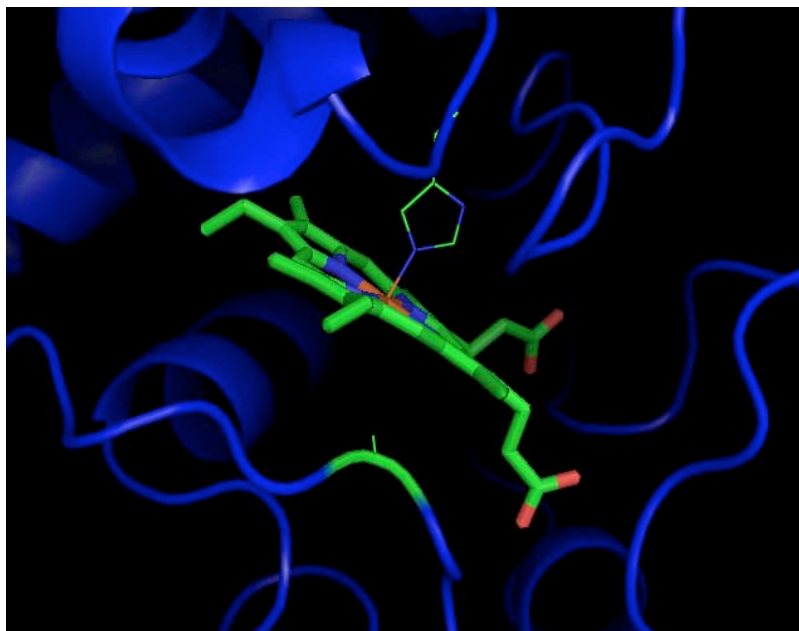


Figura 29. Cavity del grupo hemoprostético mostrando la disrupción de la sexta coordinación como efecto de la mutación puntual M80A.

Otro residuo presente en las variantes M3, M6 y M7 es el residuo lisina 79, el cual se encuentra en el acceso a la cavidad del grupo hemo, K79 fue mutado por residuos como alanina y treonina, estos cambios podrían estar relacionados con los aumentos en la actividad (1.2, 5.65 y 8.76 veces) encontrados en estas variantes. La mutación de K79 por alanina, residuo de menor tamaño, podría haberse facilitado la entrada de solvente y sustratos. Por otro lado, K79, al ser un aminoácido cargado, presenta interacciones con otros residuos en la estructura proteínica y el eliminar esa interacción con la mutación por treonina pudo haber alterado el comportamiento catalítico. Sin embargo, estos cambios tampoco influyen en gran medida en la actividad, como se observa en la oxidación de guayacol.

El cambio puntual realizado en el residuo cisteína 102 por treonina se realizó con la finalidad de evitar la dimerización del citocromo c durante su expresión heteróloga en *E. coli*. Como se observa en la figura 30, este cambio no afecta el plegamiento polipeptídico en la región carboxilo terminal del citocromo c.

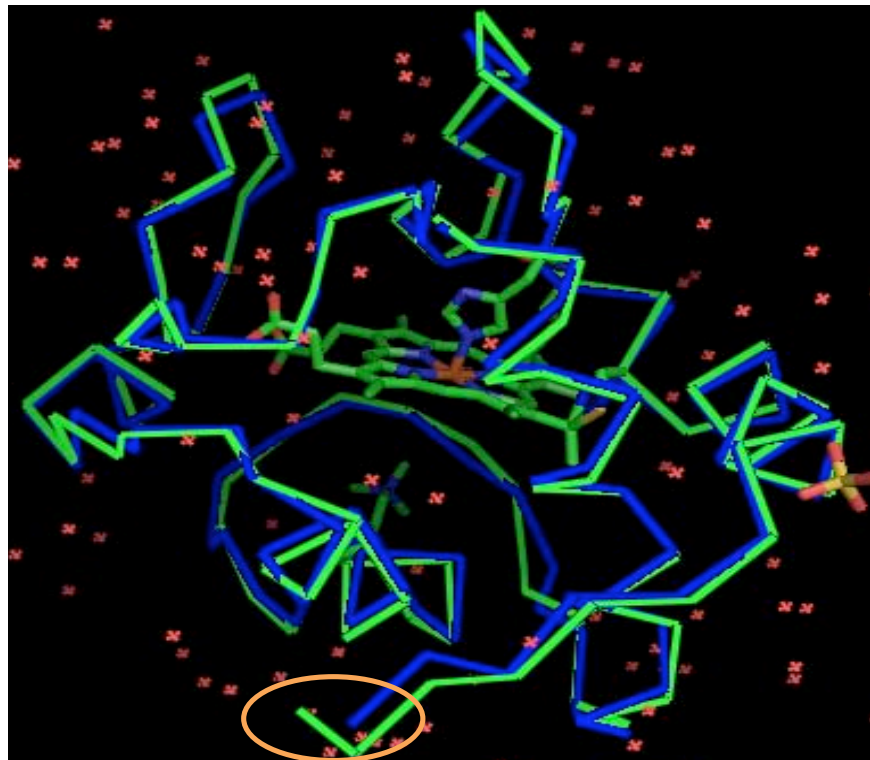


Figura 30. Empalme estructural entre el citocromo c nativo (verde) y la variante M2 (azul), dentro del círculo se encuentra la región carboxilo terminal.

En la figura 31a, se observa la red interna de puentes de hidrógeno presentes en el citocromo c. En conjunto, como se observa en la figura 31b, las mutaciones puntuales en asparagina 52, tirosina 67 y metionina 80 cambian ampliamente la red de puentes de hidrógeno dentro de la cavidad del grupo hemo prostético, propiciando la formación de un mayor espacio interno, lo que podría facilitar el acceso tanto del solvente como de los sustratos a oxidar.

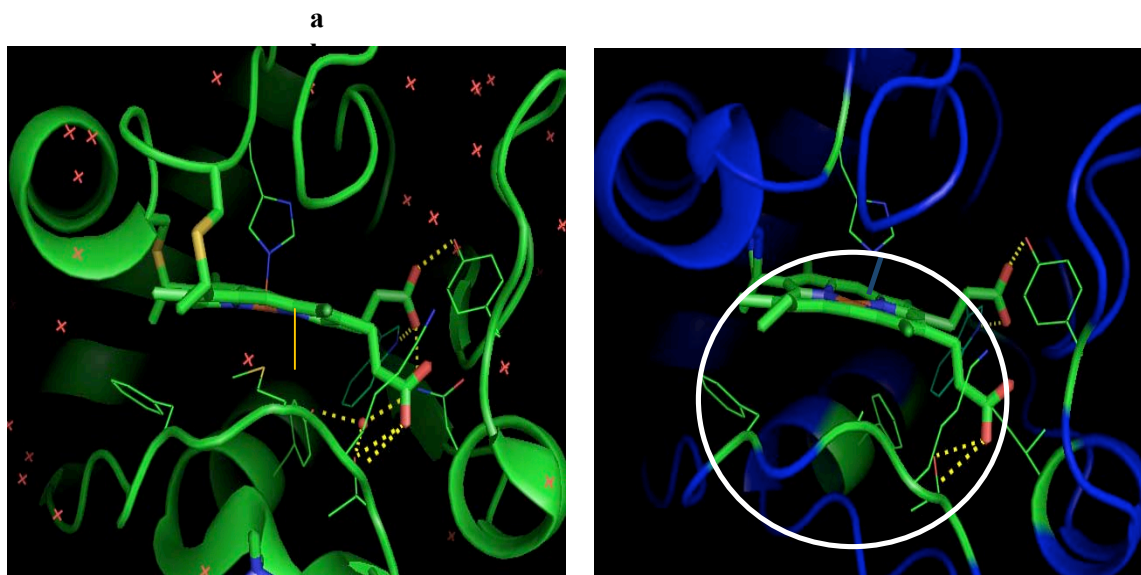


Figura 31. Distribución de puentes de hidrógeno en la cavidad hemoprostética. 31a. Espacio dentro de la cavidad del grupo hemoprostético en el citocromo c de *S. cerevisiae* (proteína nativa). 31b. Espacio dentro de la cavidad del grupo hemoprostético en la variante M2 de citocromo c.

Dado que muchos de los cambios puntuales presentes en las variantes fueron realizados por residuos con un menor volumen molecular, se propuso que tanto el volumen interno de la cavidad hemoprostética así como el área de acceso de sustratos y solventes se había alterado, generando un mayor espacio, el cual podría facilitar la entrada y la interacción de los sustratos con el grupo hemoprostético, incrementando así la actividad. Como se muestra en la figura 32b el acceso hacia el grupo hemo parece ser mayor en la variante M2, sin embargo, no fue posible estimar en cuantos \AA^2 había aumentado el área de acceso.

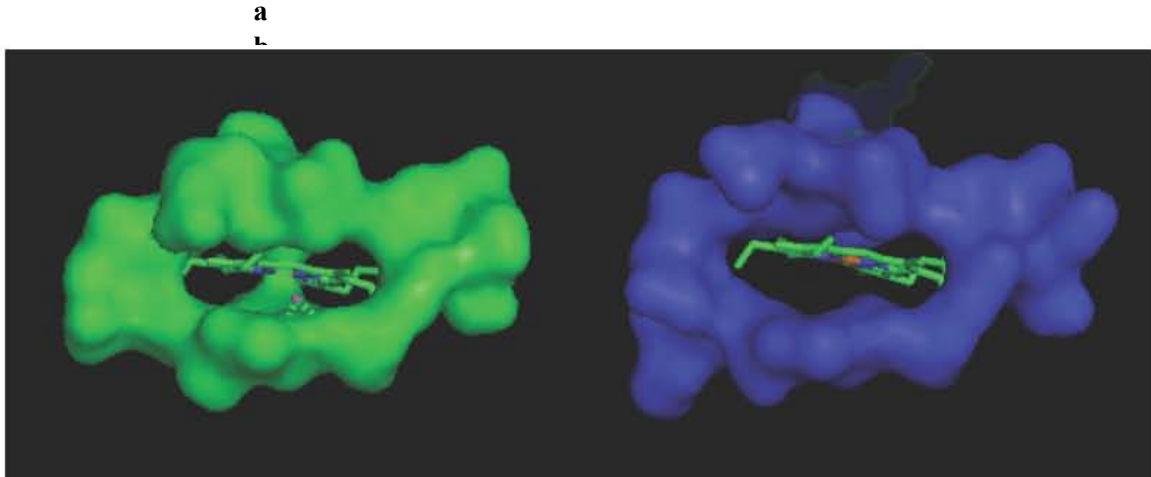


Figura 32. Acceso a la cavidad hemoprostética en los citocromos c. La figura 32a muestra el acceso hacia el grupo hemoprostético en el citocromo c nativo. La figura 32b muestra el acceso hacia el grupo hemoprostético en la variante M2.

Se decidió evaluar el efecto del cambio en el volumen interno de las cavidades hemoprostéticas con ayuda de los diferentes modelos estructurales. El volumen interno fue determinado con ayuda del servidor en internet CASTp (Dundas *et al.*, 2006), (figura 33).

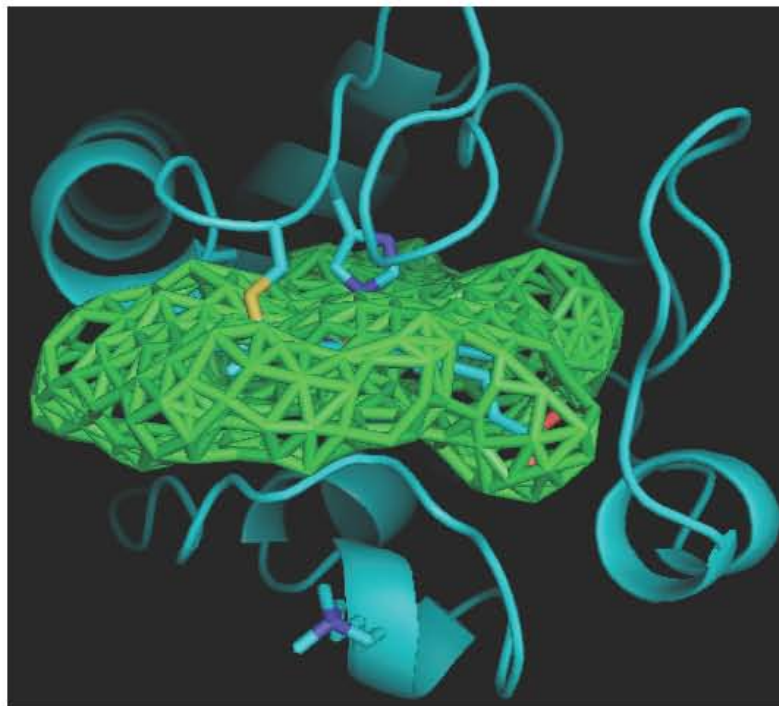


Figura 33. Volumen interno en la cavidad hemoprostética. En verde se observa el volumen de la cavidad hemoprostética.

En la tabla 14 se observa la magnitud en \AA^3 de los volúmenes internos de las variantes. Como se observa en esta tabla, el volumen de la cavidad hemoprostética aumenta de forma más significativa en variantes con mayor número de mutaciones dentro de la cavidad.

Tabla 14. Volumen interno de los diferentes modelos estructurales estimados con CASTp.

Variante	Clave	Volumen Interno \AA^3
Cyt c 1YCC	-	905.2
Cyt c nativo modelo	-	900.8
Cyt c T-5A/C102T	WT16	972.1
Cyt c T-5A/N52I/W59F/Y67F/M80I/C102T	M4	1044.4
Cyt c T-5A/N52I/W59F/Y67F/F82G/C102T	M5	1049.5
Cyt c T-5A/N52I/Y67F/C102T	M1	1113.3
Cyt c T-5A/N52I/W59F/Y67F/K79A/C102T	M3	1113.5
Cyt c T-5A/N52I/Y67F/M80A/C102T	M2	1142.9
Cyt c T-5A/N52I/W59F/Y67F/K79A/F82G/C102T	M6	1403.8

Sin embargo, al graficar los valores de actividad específica en la oxidación de guayacol contra el volumen interno de las cavidades hemoprostéticas de las variantes no se encontró alguna correlación entre el aumento de actividad hacia guayacol y el incremento de volumen interno en las variantes (figura 34).

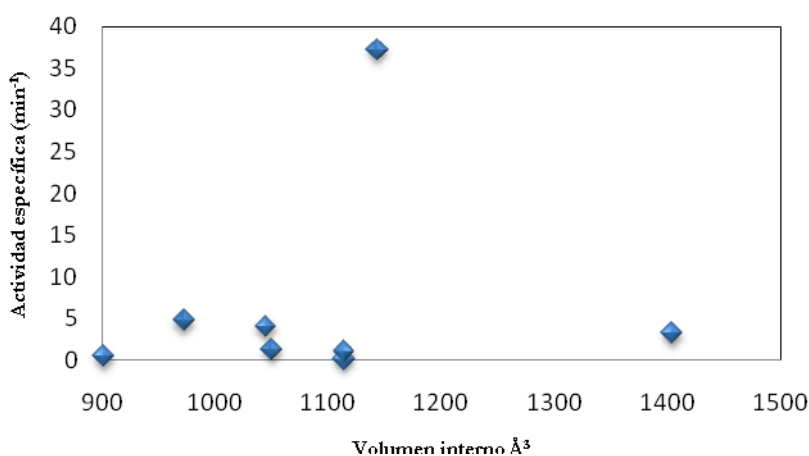


Figura 34. Efecto del volumen interno de las diferentes variantes sobre la actividad tipo peroxidasa del citocromo c de *S. cerevisiae* contra guayacol.

Lo anterior, indica que el incremento de actividad está relacionado con otros factores, como una organización del sitio activo similar a la de las peroxidasas como es el caso de la variante M2, la cual presentó los mayores incrementos en actividad con 10 de los sustratos ensayados.

7. CONCLUSIONES

En conclusión, la modificación química del citocromo c permitió aumentar su potencial redox. Sin embargo, como se demostró en este trabajo la combinación de factores como la eliminación de la sexta coordinación del grupo hemo y efectos geométricos en citocromo c, resultaron ser más importantes para incrementar la velocidad de oxidación de los compuestos fenólicos estudiados.

La modificación química de los grupos amino libres con PEG₅₀₀₀ y la metilación de los grupos carboxilo, aumentó los patrones de actividad del citocromo c para la oxidación de guayacol. Esta preparación química presentó un incremento de aproximadamente 10 veces en la actividad. Sin embargo, con otros compuestos fenólicos solo fue ligeramente mayor, probablemente como resultado de la hidrofiliidad de los sustratos. El potencial redox estimado para la preparación química fue 194 mV mayor que el de la proteína nativa, lo cual se puede relacionar con el estado de alto espín presente en esta preparación.

De las 8 variantes evaluadas, 7 variantes presentaron mayor actividad en la oxidación de guayacol que la proteína nativa. La variante M2 presentó 75 veces más actividad con respecto a la proteína nativa, siendo esta la variante con mayor actividad. No se encontró diferencias en el rango de sustratos entre la proteína nativa y la variante M2, ambas proteínas presentaron actividad con todos los sustratos ensayados, siendo la variante M2 3.23 veces más activa en promedio. El potencial redox estimado para la variante M2 fue de 1.234 V, mientras que el de la proteína nativa fue de 1.3 V, existiendo una diferencia de solo 66 mV. Basándonos en esta diferencia se puede concluir que el potencial redox no es un factor determinante en la actividad, sugiriendo que el aumento en la velocidad de oxidación de los compuestos fenólicos puede ser atribuible a factores catalíticos y no termodinámicos.

El cambio más importante para la actividad parece ser el de la metionina 80 por alanina, ya que al eliminar la sexta coordinación de la molécula de hierro del hemo se facilita la oxidación de los sustratos, efecto que se observa con el cambio del residuo 80 por isoleucina en la variante M4. Sin embargo, no es tan pronunciado como en M2, lo que nos sugiere la influencia del tamaño del residuo introducido sobre la actividad.

Con el análisis de los modelos estructurales de la proteína nativa y la variante M2, se observó que la red de puentes de hidrógeno presente en la cavidad hemoprostética se ve alterada en la variante M2 como resultado de los cambios puntuales. Se observó además un aumento en el área de acceso a la cavidad hemoprostética, el cuál, no pudo ser cuantificado. Sin embargo, el volumen interno de esta cavidad fue determinado para la variante M2, siendo 243 \AA^3 mayor que el de la proteína nativa.

8. PERSPECTIVAS

La modificación química se presenta como una técnica muy interesante no sólo desde el punto de vista de la estabilidad de las enzimas sobre diferentes factores desnaturalizantes como la temperatura, el pH ó la presencia de grandes volúmenes de solventes orgánicos en las mezclas de reacción. Como se demostró en este trabajo, por medio de la modificación con PEG₅₀₀₀ sobre los grupos amino libres y la formación de metilésteres en los carboxilos libres del citocromo c de *S. cerevisiae*, se logró aumentar el potencial redox de la proteína en 194 mV. Este resultado es muy alentador dado la gran relación entre el potencial redox y la actividad catalítica de las peroxidasas. La capacidad de obtener preparaciones químicas que, además de presentar mayor estabilidad y solubilidad en solventes orgánicos, posean un mayor poder oxidante, puede tener un impacto muy interesante en diferentes ámbitos, tanto en el campo industrial como en aplicaciones ambientales. Por lo tanto, un aspecto interesante en estudios futuros sería la evaluación de las capacidades catalíticas de estas preparaciones con sustratos hidrofóbicos y con toxicidades mayores que la de los fenoles utilizados en este trabajo.

Por otra parte, se identificó una variante con capacidades catalíticas mejoradas. Esta variante podría ser susceptible de modificación química con la finalidad de lograr un catalizador que combine las características obtenidas mediante mutagénesis sitio-dirigida y las obtenidas gracias a la modificación química. Se podrían estudiar nuevas reacciones de modificación químicas sobre la variante M2 o bien, realizar estudios de inmovilización en soportes inertes con la finalidad de obtener biocatalizadores estables y reutilizables. Estas preparaciones se podrían utilizar para realizar estudios con otros sustratos de interés ambiental, como HPAs, pesticidas organoazufrados y fosforados entre otros. Sin embargo, se requiere un estudio más detallado sobre la variante M2, con la finalidad de comprobar las conclusiones obtenidas con ayuda de los modelos estructurales. La cristalografía de rayos X destaca como la alternativa por excelencia para realizar este estudio, por esta razón se plantean como perspectivas de este trabajo la producción de la variante M2 en cantidades que permitan la producción de cristales de buena calidad para estos experimentos.

9. BIBLIOGRAFÍA

Ahuja, S. K., Ferreira G. M. and Moreira A. R. (2004). Utilization of enzymes for environmental applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 24:125-154.

Akasaka, R., Mushino, T. and Hirobe, M. (1993). Cytochrome P450-like substrate oxidation catalyzed by cytochrome c and immobilized cytochrome c. *Arch. Biochim. Biophys.* 301:355-360.

Akasaka, R., Mushino, T. and Hirobe, M. (1994). Hydroxylation of benzene by immobilized cytochrome c in organic solvent. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 1:1817-1821.

Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45:180-209.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1999). Short protocols in molecular biology. F.M. Ausubel *et al.*, Eds. New York, NY. pp 1104.

Autenrieth, R. L., Bonner, J. S., Akgerman, A., Okaygun, M. and McCreary, E. M. (1991). Biodegradation of phenolic wastes. *J. Hazard. Mater.* 28:29-53.

Ayala, M., Roman, R. and Vazquez-Duhalt, R. (2007). A catalytic approach to estimate the redox potential in heme-peroxidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357:804-808.

Banci, L., Bertini, I., Bren, K.L., Gray, H. B., Sompompisut, P. and Turano, P. (1997). Solution structure of oxidized *Saccharomyces cerevisiae* iso-1-cytochrome c. *Biochemistry.* 36:8992-9001.

Barr, D. P. and Mason, R. P. (1995). Mechanism of radical production from reaction of cytochrome c with organic hydroperoxides. *J. Biol. Chem.* 270:12709-12716.

Berghuis, A. M. and Brayer, G. D. (1992). Oxidation state-dependent conformational changes in cytochrome c. *J. Mol. Biol.* 223:959-976.

Berghuis, A. M., Guillemette, J. G., Smith, M. and Brayer, G. D. (1994). Mutation of tyrosine-67 to phenylalanine in cytochrome c significantly alters the local heme environment. *J. Mol. Biol.* 235:1326-1341.

Beszedits, S. and Silbert, M. D. (1990). Treatment of phenolic wastewaters. B & L information services. Toronto, Canada.

Bogan, B. W., Lamar, R. T. and Hammel, K. E. (1996). Fluorene oxidation *in vivo* by *Phanerochaete crysosporium* and *in vitro* during manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1788-1792.

- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–254.
- Buitrón, G., González, A. and López-Marín, L. M.** (1998). Biodegradation of phenolic compounds by an acclimated activated sludge and isolated bacteria. *Water Sci. Technol.* **37**:371-378.
- Busi, E., Howes, B. D., Pogni, R., Basosi R., Tinoco, R. and Vazquez-Duhalt, R.** (2000). Modified cytochrome c c/H₂O₂ system: spectroscopic EPR investigation of the biocatalytic behaviour. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* **9**:39-48.
- Chance, B. and Maehly, A. C.** (1955). Assay of catalases and peroxidases. In *Methods in Enzymology*. Colowick, S.P., and Kaplan, N.O., Eds. Academic Press New York. **12**:764-801.
- Chang, Y. J., Nishio, N. and Nagai, S.** (1995). Characteristics of granular methanogenic sludge grown on phenol synthetic medium and methanogenic fermentation of phenol wastewater in a UASB reactor. *J. Fermentation Bioeng.* **79**(4):248-253.
- Cunningham, S. D. and Ow, D. W.** (1996). Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.* **110**:715-719.
- d' Acunzo, F., Galli, C., Gentili, P. and Sergi F.** (2006). Mechanistic and steric issues in the oxidation of phenolic and no-phenolic compounds by laccase or laccase-mediator systems. *New J. Chem.* **30**:583-591.
- DePillis, G. D., Ozak, S., Kuo, J. M., Maltby, D. A. and Ortiz de Montellano, P. R.** (1997). **Autocatalytic processing of heme by lactoperoxidase produces the native protein-bound prosthetic group.** *J. Biol. Chem.* **272**:8857-8860.
- Dickerson, R. E.** (1980). The evolution of protein structure and function. Academic Press, New York. pp. 173.
- Dundas, J., Ouyang, Z., Tseng, J., Binkowski A., Turpaz, Y. and Liang, J.** (2006). CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acid Res.* **34**:116-118.
- Dunford, H. B.** (1999). Heme peroxidases. Wiley-VCH, NewYork.
- Durant, J. L., Busby, W. F., Lafleur, A. L., Penman, B. W. and Crespi, C. L.** (1996). Human cell mutagenicity of oxygenated, nitred and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons with urban aerosols. *Mutation Res.* **371**:123-157.
- Estevez-Nuñez, A., Caballero, A. and Ramos, J.** (2001). Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiol. Mol. Rev.* **65**:335-352.

- Fenoll, L. G., García-Molina, F., Gilabert, M. A., Varón, R., García-Ruiz, P. A., Tudela, J., García-Cánovas, F. and Rodríguez-López, J. N.** (2005). Interpretation of the reactivity of peroxidase compound II with phenols and anilines using the Marcus equation. *Biol. Chem.* 386:351-360.
- Florence, T. M. J.** (1985). The degradation of cytochrome *c* by hydrogen peroxide. *J. Inorg. Biochem.* 23:131-141.
- Folkes, L. K. and Candeias, L. P.** (1997). Interpretation of the reactivity of peroxidase compounds I and II with phenols by the Marcus equation. *FEBS Lett.* 412:305-308.
- Fujita, A., Senzu, H., Kunitake, T. and Hamachi, I.** (1994). Enhanced peroxidase activity of cytochrome *c* by phosphate bilayer membrane. *Chem. Lett.* 23:1219-1222.
- Fujita, M., Ike, M., Kawagoshi, Y. and Miyata, N.** (2000). Biotreatment of persistent substances using effective microorganism. *Water Sci. Technol.* 42:93-106.
- Fumo, G. Spitzer, G. and Fetrow J. S.** (1995). A method of directed random mutagenesis of yeast chromosome shows that iso-1-cytochrome *c* heme ligand his18 is essential. *Gene.* 164:33-39.
- Gaertner, H. F. and Puigserver, A. J.** (1992). Increased activity and stability of poly(ethylene glycol)-modified trypsin. *Enzyme Microb. Technol.* 14:150-155.
- García-Arellano, H., Valderrama B, Saab-Rincón G. and Vazquez-Duhalt R.** (2002). High temperature biocatalysis by chemically modified cytochrome *c*. *Bioconjugate Chem.* 13:11237-11245.
- Gianfreda, L. and Bollag, J.** (2002). Isolated enzymes for the transformation and detoxification of organic pollutant. In: *Enzymes in the environment: activity, ecology, and application*. Burns, R., and Dick, R. Eds. New York: Marcel Dekker. pp. 495-538.
- Gianfreda, L. and Rao, M. A.** (2004). Potential of extracellular enzymes in remediation of polluted soils: A review. *Enzyme Microb. Technol.* 35:339-354.
- Hammel, K. E., Kalyanaraman, B. and Kirk, K.** (1986). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon and dibenzo[*p*]-dioxins by *Phanerochaete cryosporium* ligninase. *J. Biol. Chem.* 261:16948-16952.
- Harel, S. and Kenner, J.** (1985). The Generation of ferryl or hydroxyl radicals during interaction of haemproteins with hydrogen peroxide. *Free Radic. Res. Commun.* 5:21-33.
- Horton, R. M. and Pease, L. R.** (1991). Recombination and mutagenesis of DNA sequences using PCR. In: *Directed Mutagenesis. A practical approach*. McPherson, M. J., Ed. IRL Press, Oxford, UK. pp. 217-247.
- International Agency for Research on Cancer** (1983). Polynuclear aromatic aromatic hydrocarbons Part 1. *Chemical, environmental and experimental data*. Lyon, France.

- Kanally, R. and Harayama, S.** (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. Mini review. *J. Bacteriol.* 182:2059-2067.
- Klyachko, N. L. and Klivanov, A. M.** (1992). Oxidation of benzothiophene catalysed by haemoglobin and other hemoproteins in aquos-solvent media. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 37:53-68.
- Kononova, S. V. and Nesmeyanova, M. A.** (2002). Phosphonates and their degradation by microorganism. *Biochem.* 67:184-195.
- Lett, M. and Guillemette, J. G.** (2002). Increasing the redox potential of isoform 1 of yeast cytochrome c through the modification of select haem interactions. *Biochem. J.* 362:381-387.
- Lind, J., Shen, T., Eriksen, T. E. and Merényi, G.** (1990). The one-electron reduction potential of 4-substituted phenoxyl radicals in water. *J. Am. Chem. Soc.* 112:479-482.
- Louie, G. V. and Brayer, G. D.** (1990). High-resolution refinement of yeast iso-1-cytochrome c and comparisons with other eukaryotic cytochromes c. *J. Mol. Biol.* 214:527-555.
- Luntz, T. L., Schejter, A., Garber, E. A. E. and Margoliash, E.** (1989). Structural significance of internal water molecule studied by site-directed mutagenesis of tyrosine-67 in rat cytochrome c. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 86:3524-3528.
- Marcus, R. A. and Suttin, N.** (1985). Electrotransfers in chemistry and biology. *Biochim. Biophys. Acta.* 811:265-322.
- Mauk, G. A.** (1991). Electron-transfer in genetically engineered proteins –the cytochrome-c paradigm. *Struc. Bonding.* 75:131-157.
- Minussi, R. C., Pastore, G. M. and Durán N.** (2002) Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 13:205-216.
- Murialdo, S. E., Fenoglio, R., Haure, P. M. and González, J. F.** (2003). Degradation of phenol and chlorophenols by mixed and pure cultures. *Water SA.* 29:457-463.
- Ortiz-Leon, M., Velasco, L. and Vazquez-Duhalt, R.** (1995). Biocatalytic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by hemoglobin and hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215:968-973.
- Parales, R. E. and Haddock, J. D.** (2004). Biocatalytic degradation of pollutants. *Curr. Opinion Biotechnol.* 15:374-379.
- Paul, D., Pandey, G., Pandey, J. and Jain, R. K.** (2005). Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. *Trends Biotechnol.* 23:135-142.
- Pieper, D. H., Martins dos Santos, V. A. and Golyshin, P. N.** (2004). Genomic and mechanistic insight into the biodegradation of organic pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15:215-224.

- Pointing, S. B.** (2001). Feasibility of bioremediation using white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:20-33.
- Rabinovich, M. L., Bolova, A. V. and Vasilchenko, L. G.** (2004). Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotic: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 40:1-17.
- Radi, R., Thomson, L., Rubbo, H. and Prodanov, E.** (1991). Cytochrome *c*-catalyzed oxidation of organic molecules by hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 288:112-117.
- Schejter, A., Luntz, T. L., Koshy, T. I. and Margoliash, E.** (1992). Relationship between local and global stabilities of proteins: site-directed mutants and chemically modified derivatives of cytochrome *c*. *Biochemistry.* 31:8336-8343.
- Shetty, P. K., Miltra, J., Murthy, N. B. K., Namitha, K. K. Savitha, K. N. and Raghu, K.** (2000). Biodegradation of cyclodine insecticide endosulfan by *Mucor thermohyalospora* MTCC 1384. *Curr. Sci.* 79:1381-1383.
- Stucki, G. and Alexander, M.** (1987). Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. *Appl. Environ Microbiol.* 53:292-297.
- Sutherland, T. D., Home, I., Weir, K. M. Coppin, C. W., Williams M. R., Selleck, M. Russell, R. J. and Oakeshott J. G.** (2004). Enzymatic bioremediation: from enzyme discovery to applications. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31:817-821.
- Swoboda-Colberg, N. G.** (1995). Chemical contamination of the environment: Sources, types, and fate of synthetic organic chemicals. In: *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. Young, C.Y., Cerniglia, C.E. Eds. Wiley-Liss, New York. pp. 27-74.
- Tappel, A. L.** (1955). The mechanism of the oxidation of unsaturated fatty acids catalyzed by hematin compounds *Arch. Biochem. Biophys.*44:368-395.
- Tay, J. H., He, Y. X. and Yan, Y. G.** (2001). Improved anaerobic degradation of phenol with supplemental glucose. *J. Environ. Eng., ASCE.* 127(1):38-45.
- Tinoco, R. and Vazquez-Duhalt, R.** (1998). Chemical modification of cytochrome *c* improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Enzyme Microb. Technol.* 22:8-12.
- Torres, E. and Vazquez-Duhalt, R.** (2000). Chemical modification of hemoglobin improves biocatalytic oxidation of PAH's. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273:820-823.
- Torres, E., Sandoval, J. V., Rosell, F. I., Mauk, G. and Vazquez-Duhalt, R.** (1995). Site-directed mutagenesis improves biocatalytic activity of iso-1-cytochrome *c* in polycyclic hydrocarbon oxidation. *Enzyme Microb. Technol.* 17:1014-1020.
- Thurgood, A. G. P., Pielak, G. J., Cutler, R. L., Davies, A. M., Greenwood, C., Mauk, A. G., Smith, M., Williamson, D. J. and Moore, G. R.** (1991). Change in charge

of an unvaried heme contact residue does not cause a major change of conformation in cytochrome c. *FEBS Lett.* 284:173-177.

Valderrama, B., García-Arellano, H., Giansanti, S., Camilla-Barato, M., Pogni, R. and Vazquez-Duhalt, R. (2006). Oxidative stabilization of iso-1-cytochrome c by redox-inspired protein engineering. *FASEB J.* 20:1233-1235.

Vazquez-Duhalt, R. (1998). Hemoproteins as biocatalyst for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In *Advances in Bioprocess Engineering II*. Galindo, E., Ramirez, O. T. Eds. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 183-207.

Vazquez-Duhalt, R. (1999). Cytochrome c as biocatalyst. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 7:241-249.

Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D. W. S. and Fedorak, P. M. (1993a). Cytochrome c as a biocatalyst for the oxidation of thiophenes and organosulfides. *Enzyme Microb. Technol.* 15:494-499.

Vazquez-Duhalt, R., Semple, K. M., Westlake, D. W. S. and Fedorak, P. M. (1993b). Effect of water-miscible organic solvents on the catalytic activity of cytochrome c. *Enzyme Microb. Technol.* 15:936-946.

Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D. W. S. and Fedorak, P. M. (1994). Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Appl. Environ Microbiol.* 60:459-466.

Villegas, J. A., Mauk, A.G. and Vazquez-Duhalt, R. (2000). A cytochrome c variant resistant to heme degradation by hydrogen peroxide. *Chem. Biol.* 7:237-244.

Wallace, C. J. A., Mascgni, P., Chait, B. T., Collawn, J. F., Paterson, Y., Proudfoot, A. E. I. and Kent, S. B. H. (1989). Substitutions engineered by chemical synthesis at three conserved site in mitochondrial cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 264:15199-15209.

Wirén-Lehr, S., Castillo, M., Tortensoon, L. and Scheunert, I. (2001). Degradation of isoproturon in biobeds. *Biol. Fertility Soils.* 33:535-540.

Xu, F. (1996). Oxidation of phenols, anilines and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochem.* 35:7608-7614.

Zhong-Hua, W., Ying-Wu, L., Rosell, F. I., Feng-Yun, N., Hao-Jie, L., Peng-Yuang, Y., Xiang-Shi, T., Xiao-Yuan, L., Zhong-Xian, H. and Mauk, A. G. (2007). Converting cytochrome c into a peroxidase-like metalloenzyme by molecular desing. *ChembioChem.* 8:607-609.