

ESTUDIOS MULTIDISCIPLINARIOS EN SISTEMAS REDOX: DESENTRAÑANDO EL MISTERIO DE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE LA ZO PEROXIDASA

Gil-Rodríguez, P., Giansanti, S., Baratto, M.C., Pogni, R., Valderrama, B.

Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, Morelos, México, gil@ibt.unam.mx.

Por su versatilidad las peroxidasas se han utilizado en diversos procesos biotecnológicos. Sin embargo, una de las principales limitantes para la aplicación de estas enzimas, es la desactivación por daño oxidativo al ser expuestas al H_2O_2 . Recientemente se ha identificado una isoforma de hemo-peroxidasa en las raíces del rábano japonés (*Raphanus sativus* L. var. Daikon) llamada Zo peroxidasa (ZoPrx), la cual presenta una resistencia inusual a la desactivación por daño oxidativo. Esta enzima ha sido un objeto interesante de estudio debido a su particular propiedad de estabilidad. Tras la identificación de esta peroxidasa, se realizó su caracterización bioquímica, que consistió en la valoración del efecto del H_2O_2 sobre la actividad catalítica, la determinación de sus constantes catalíticas, así como la secuenciación parcial por medio de espectrometría y su caracterización espectroscópica por UV-Visible, dicroísmo circular (DC) y resonancia paramagnética de electrones (EPR).

La ZoPrx se identificó por su secuenciación parcial mediante espectrometría de masas teniendo una mayor similitud con la iso-enzima aniónica 53 de *Arabidopsis thaliana* y con la iso-enzima aniónica 2 de *Armoracia rusticana* (HRPA2). Una diferencia notable entre la ZoPrx y la HRPA2 es su perfil de desactivación ante diferentes condiciones, en la ZoPrx se observa una mayor estabilidad con una actividad de catalasa menor que la de la HRPA2. Con esto podemos decir que la estabilidad de la ZoPrx no es producto de la protección de su actividad de catalasa.

El ciclo catalítico de la ZoPrx, como el de las peroxidasas de la clase III, consta de tres pasos en el que la enzima utiliza al H_2O_2 para oxidarse a un primer intermediario llamado compuesto I, posteriormente dos moléculas de sustrato reductor lleva a la enzima a un compuesto III y consecutivamente al estado basal. Respecto al análisis de sus constantes catalíticas, la eficiencia catalítica de la peroxidasa labil HRPA2 y la ZoPrx resultan similares. Interesantemente, las constantes que describen su ciclo catalítico k_1 y k_3 son significativamente diferentes para ambas peroxidasas. Con esto se puede suponer que el paso limitante en la catálisis de la ZoPrx es el regreso al estado basal a partir del Compuesto II, en contraste con la HRPA2 donde el paso limitante es la formación del Compuesto I.

Se ha descrito a un tercer compuesto llamado compuesto III como un intermediario de la desactivación. Gracias a las características del grupo hemo se han utilizado diferentes técnicas como dicroísmo circular, UV-Visible y resonancia paramagnética de electrones para caracterizar al compuesto III y su decaimiento. En los espectros de DC y UV-Visible del decaimiento del compuesto III de la ZoPrx, se observan diferencias significativas con respecto al estado basal. Estos datos conjuntamente con los obtenidos de los espectros de EPR nos sugieren que a pH 6.1 el compuesto III decae a un compuesto con una configuración electrónica diferente al estado basal. Y aun con estas diferencias en su configuración este compuesto mantiene su capacidad catalítica.

Agradecimientos: A Sonia Rojar, Mario Caro. Este proyecto fue financiado por CONACYT 50581 y PAPITT 202407