

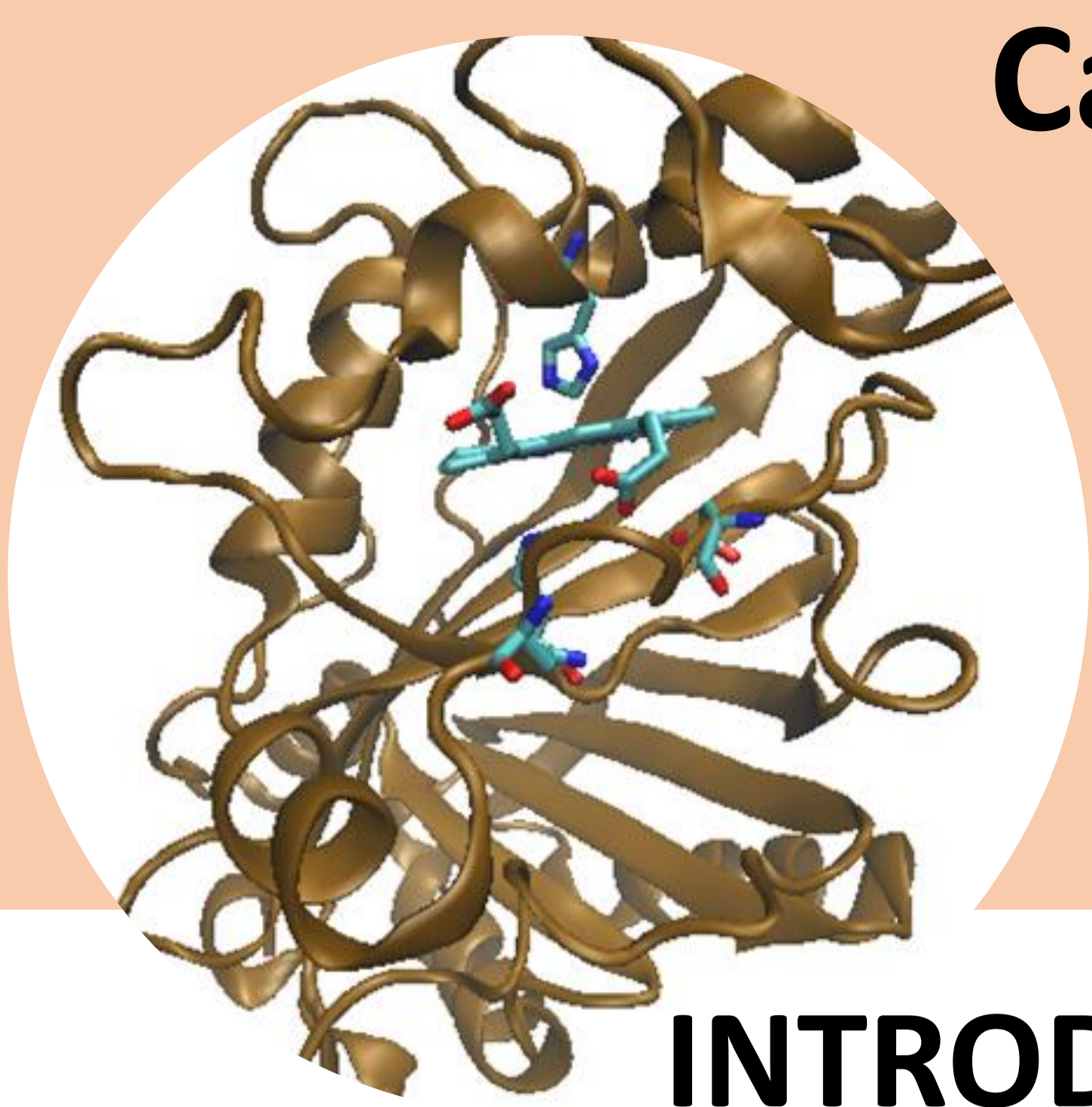
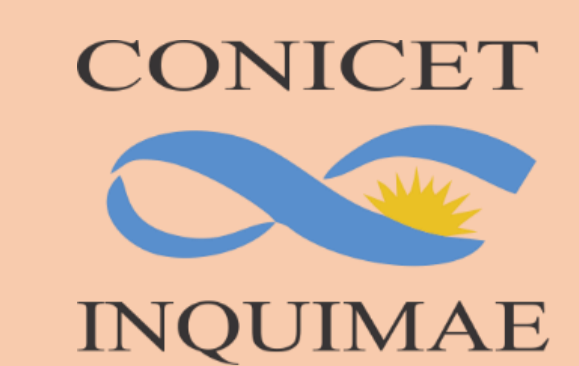
Caracterización espectroelectroquímica de una *Dye Decolorizing Peroxidase* tipo-A

Scozza, Magalí F.¹; Martins, Lígia O.²; Murgida, Daniel H.¹

¹Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física – INQUIMAE, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires – CONICET, Buenos Aires Argentina.

²Instituto de Tecnología Química e Biológica; Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal.

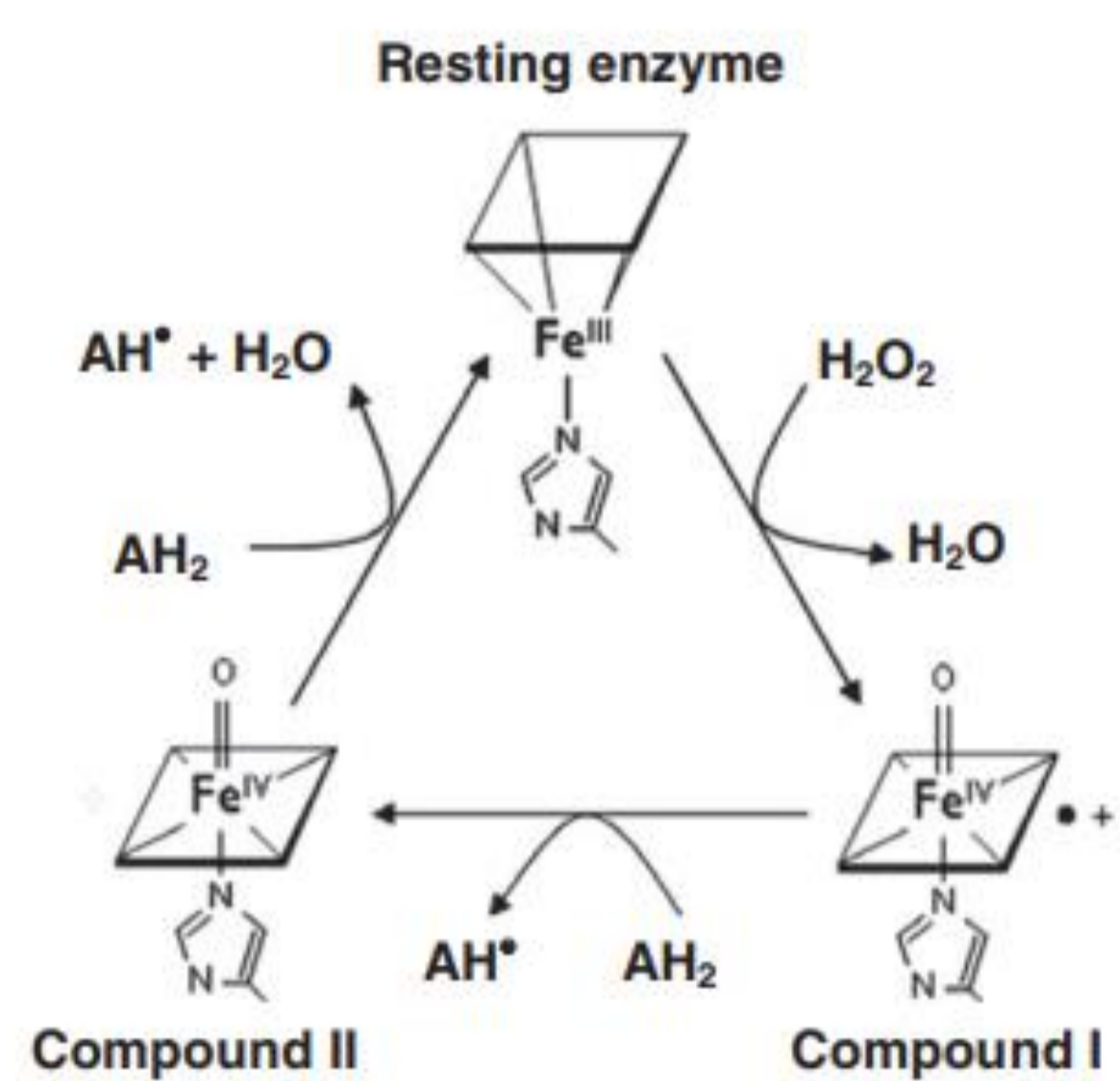
MagaliScozza@gmail.com



INTRODUCCIÓN

Las *Dye decolorizing peroxidases* (DyPs) son hemoperoxidasas encontradas en bacterias y hongos que catalizan un gran número de reacciones oxidativas de una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos, mediante la reducción de peróxido de hidrógeno. Presentan actividad óptima a pHs ácidos.

Mecanismo general de las peroxidadas:

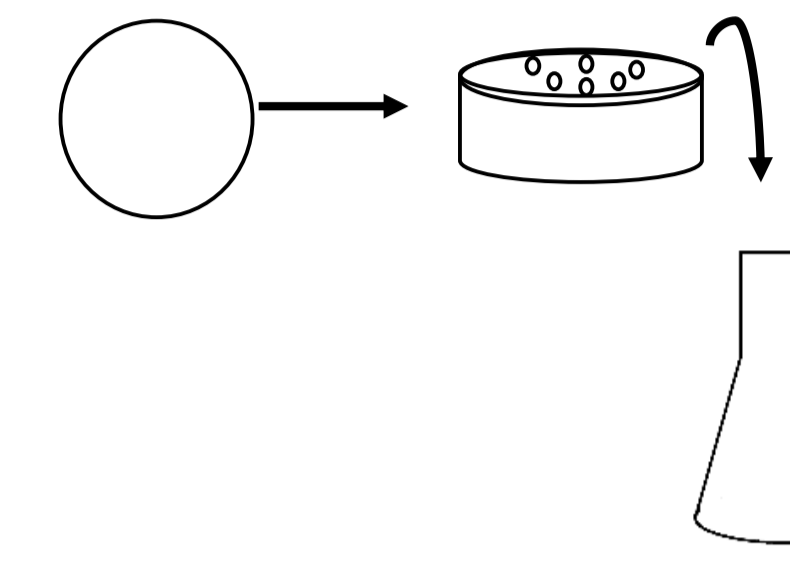


Los aspectos termodinámicos y cinéticos del ciclo catalítico se encuentran influenciados por los E° de tres cuplas redox: *Compound I*/Fe³⁺, *Compound I*/*Compound II* y *Compound II*/Fe³⁺.

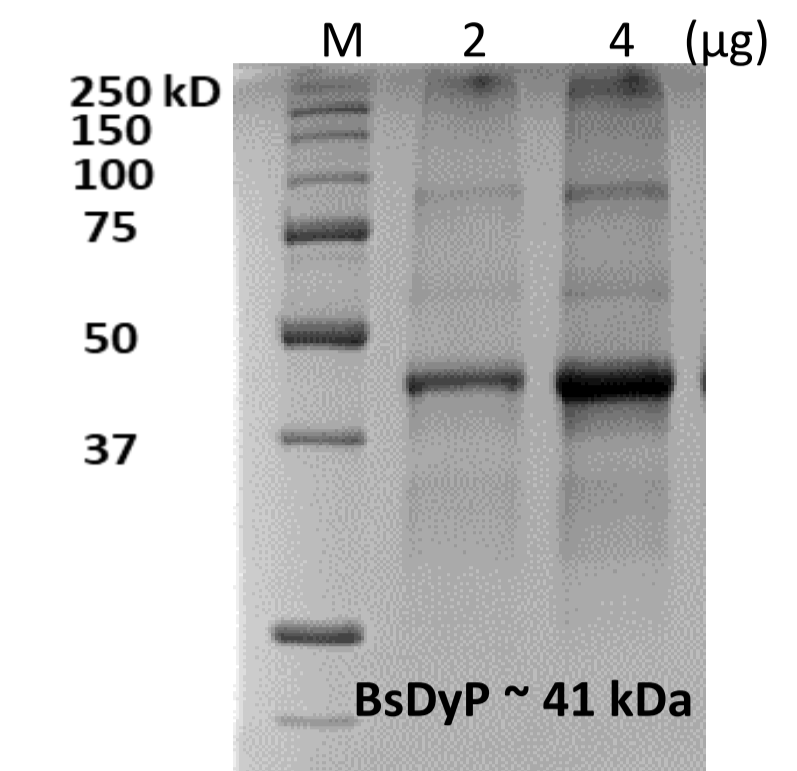
Presentamos un estudio espectroelectroquímico de BsDyP (de *Bacillus subtilis*), una DyP tipo A.

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN

Transformamos *E. coli* con plásmido conteniendo la secuencia de BsDyP



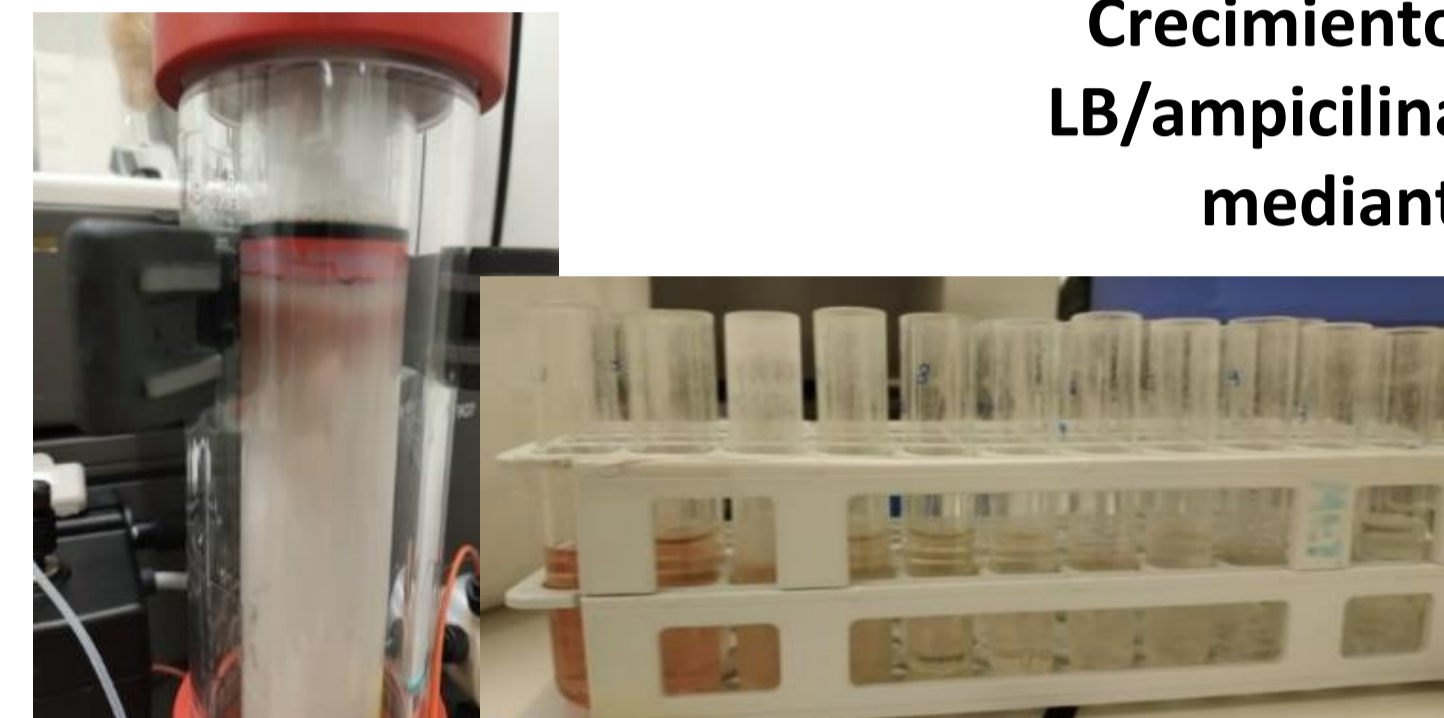
Purificación de 2 pasos: cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular



Gel SDS-PAGE

Valor Reinheitszahl ($A_{\text{Soret}}/A_{280\text{nm}}$): 1.4.

Crecimiento en medio LB/ampicilina. Inducción mediante IPTG

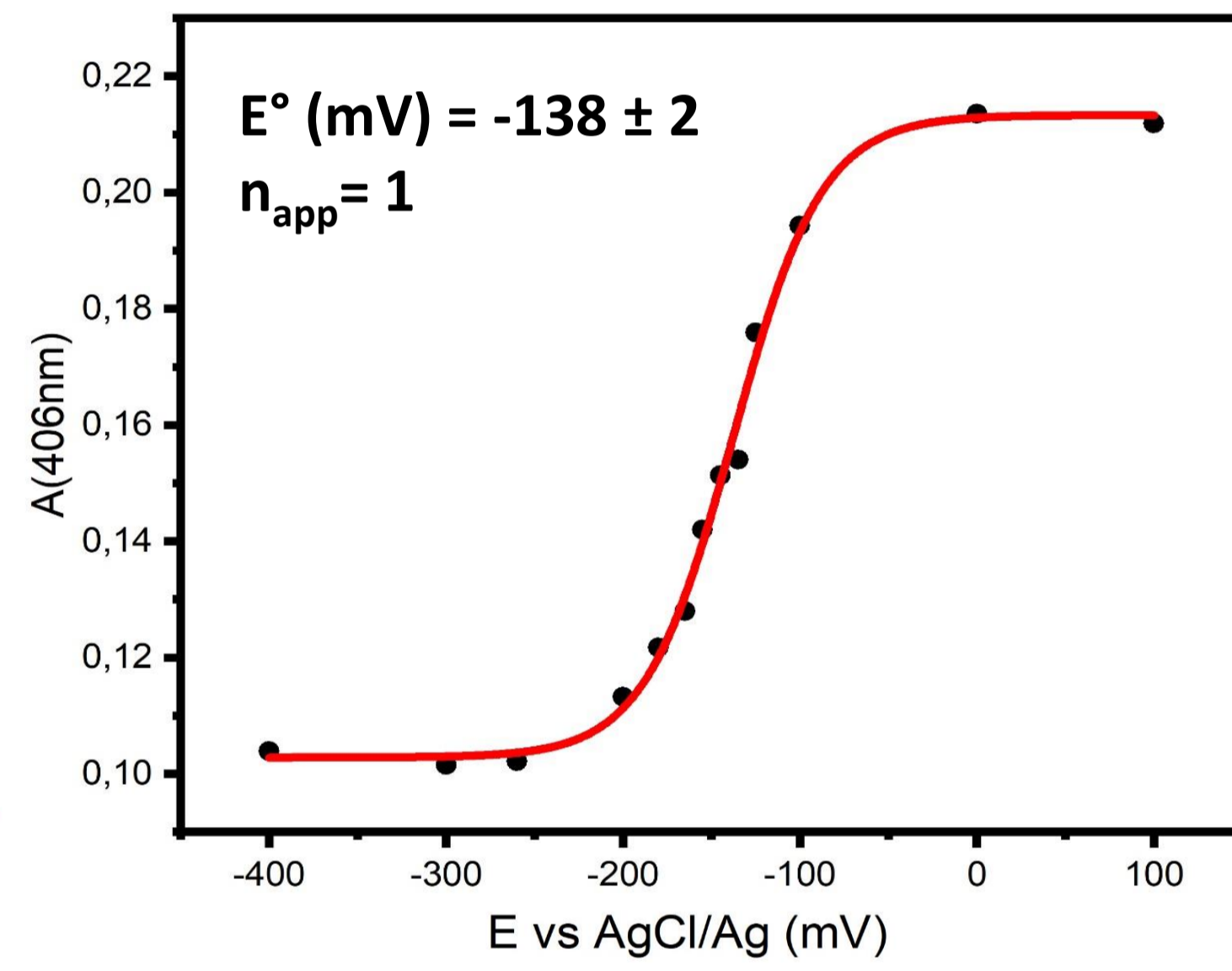
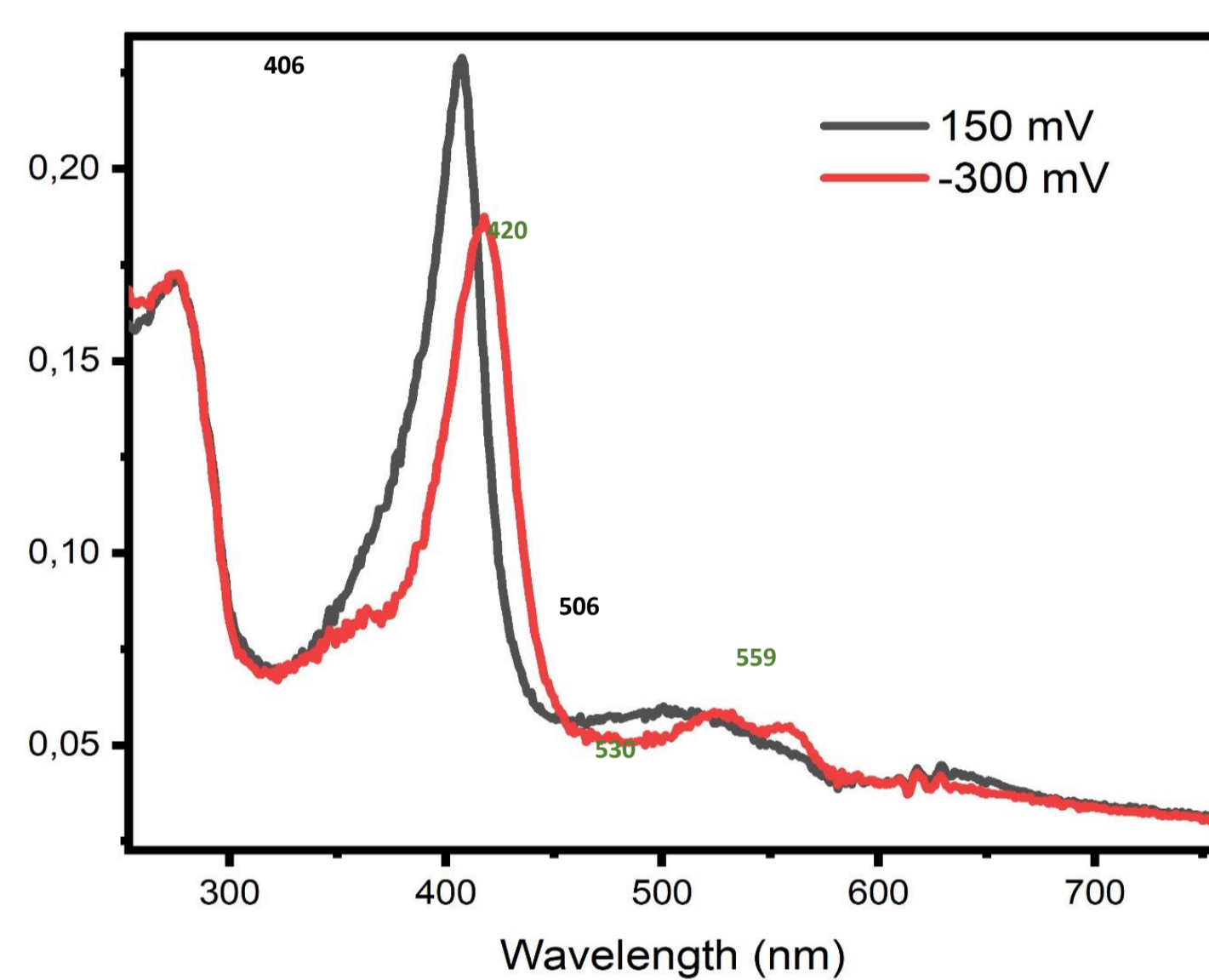


La expresión y purificación de BsDyP fue realizada en el Instituto de Tecnología Química e Biológica; Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal.

TITULACIÓN ESPECTROELECTROQUÍMICA

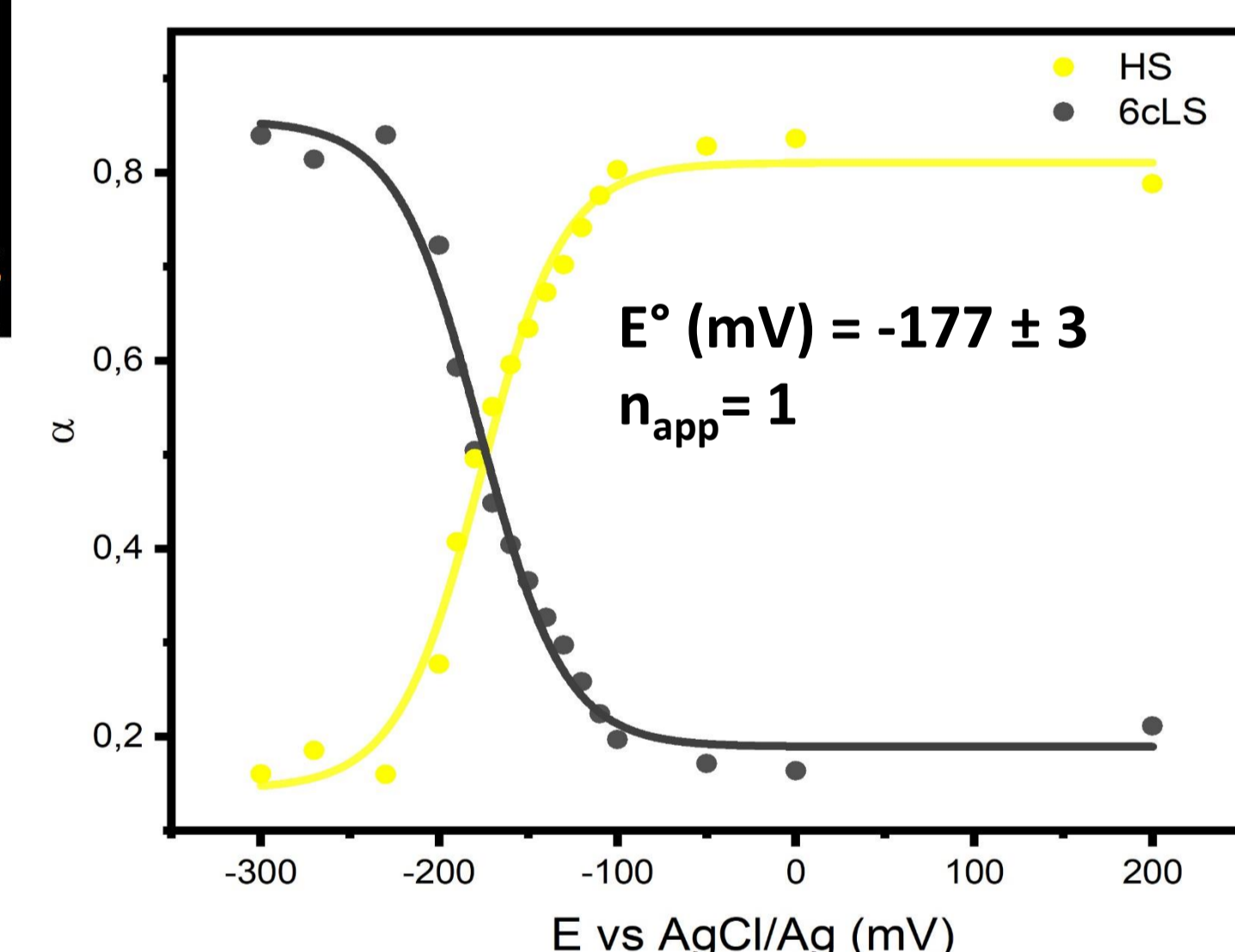
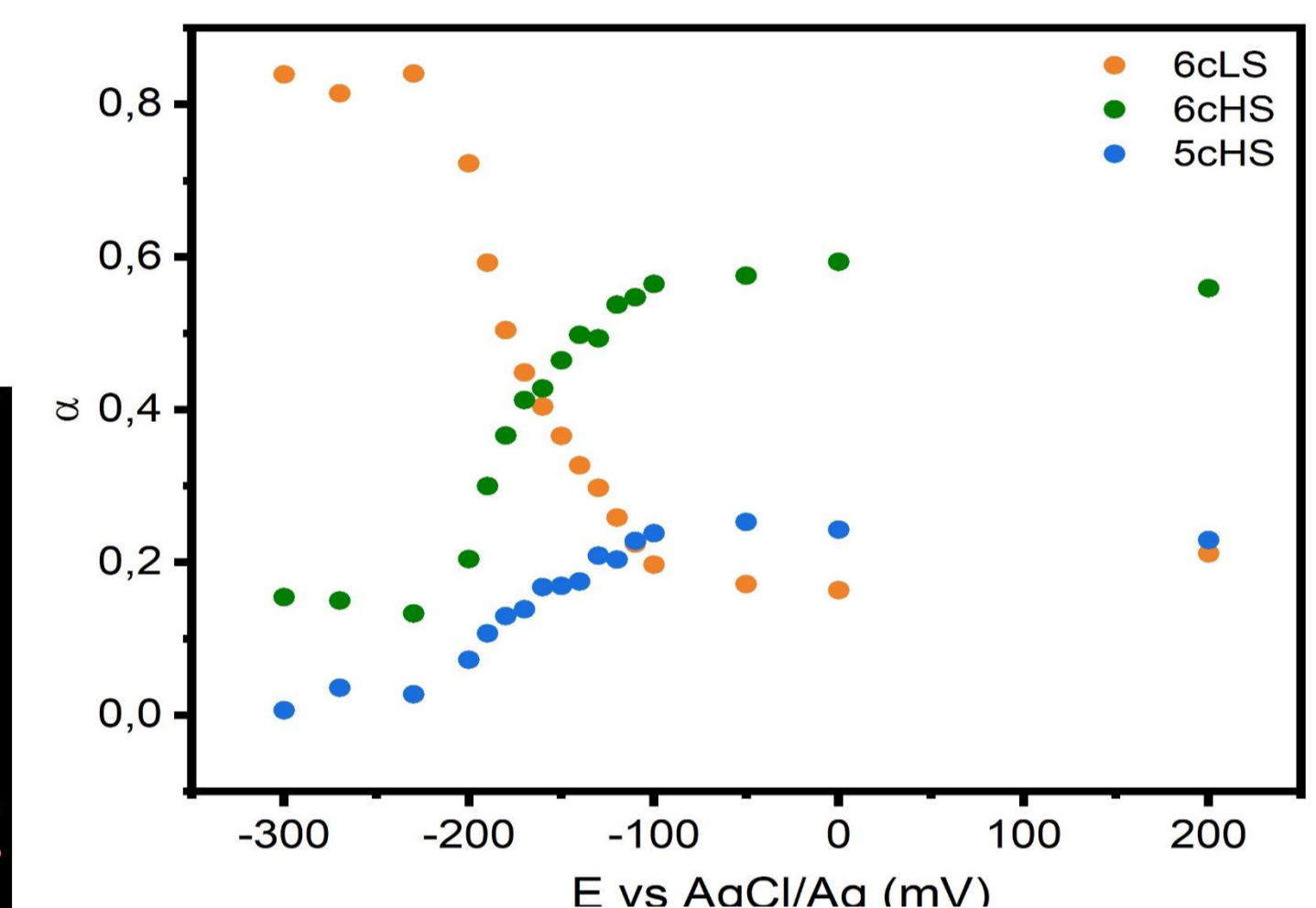
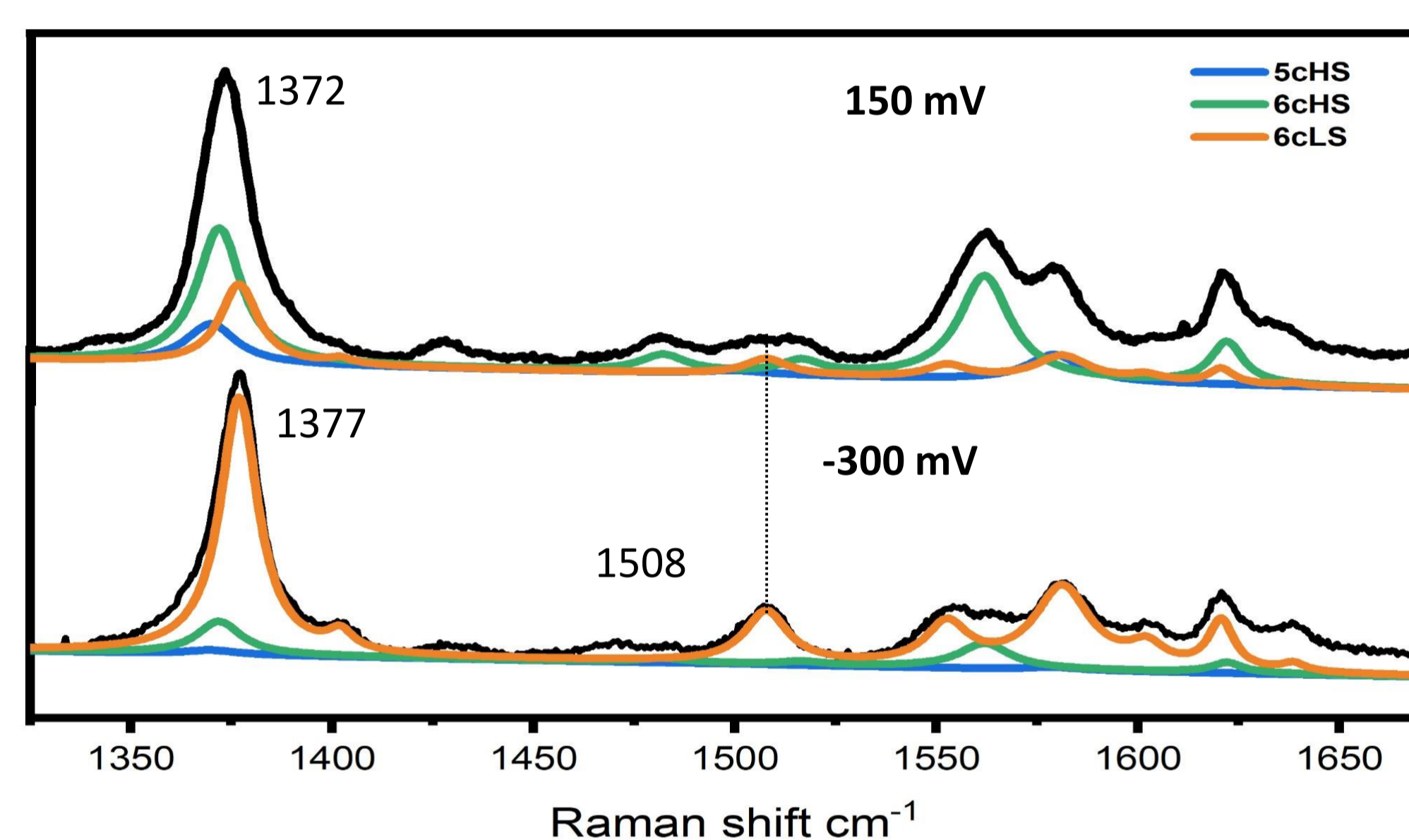
UV-VIS

Monitoreamos el cambio en la absorbancia a 406 nm en función del potencial aplicado.



RAMAN RESONANTE

RR nos permite monitorear el estado redox, de espín y la coordinación del hemo.

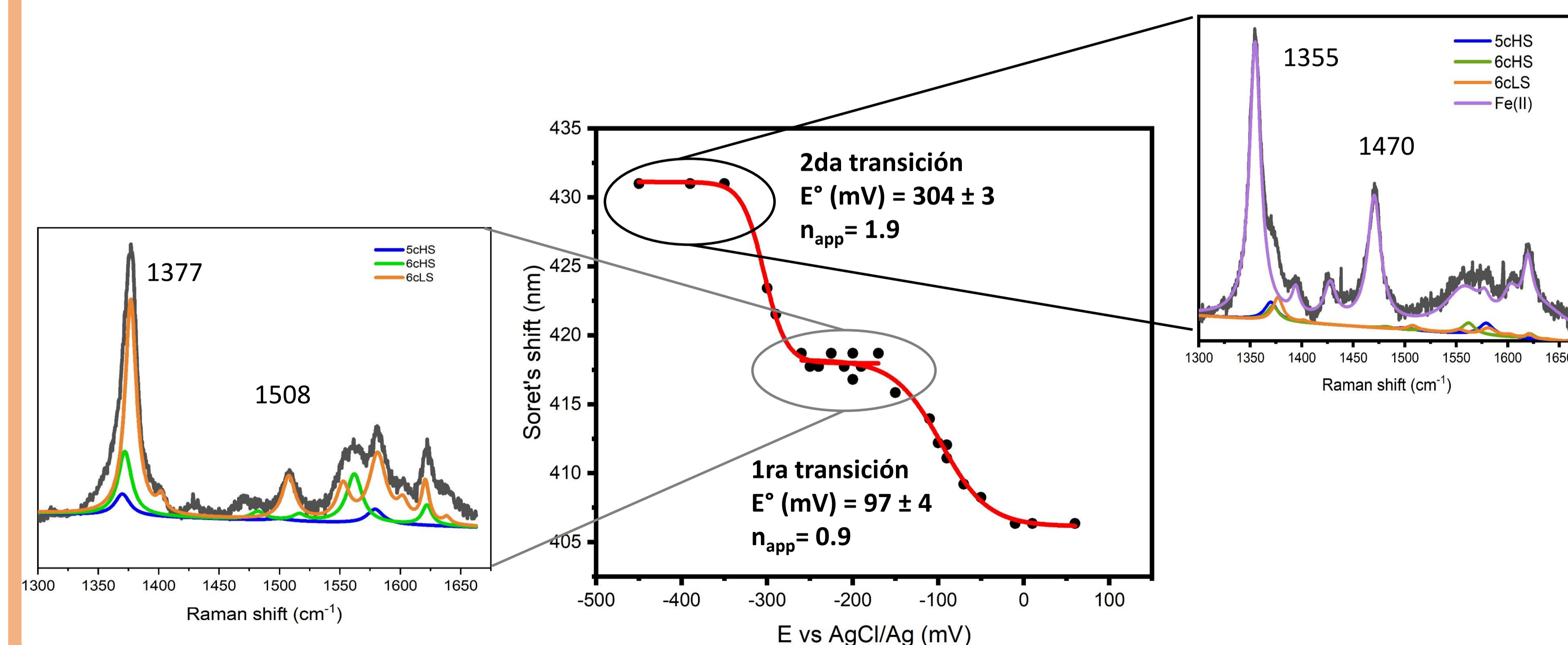


Observamos un cambio conformacional acoplado al potencial aplicado, obteniéndose una especie oxidada bajo espín hexacoordinada (**6cLS**) con potencial reductor.

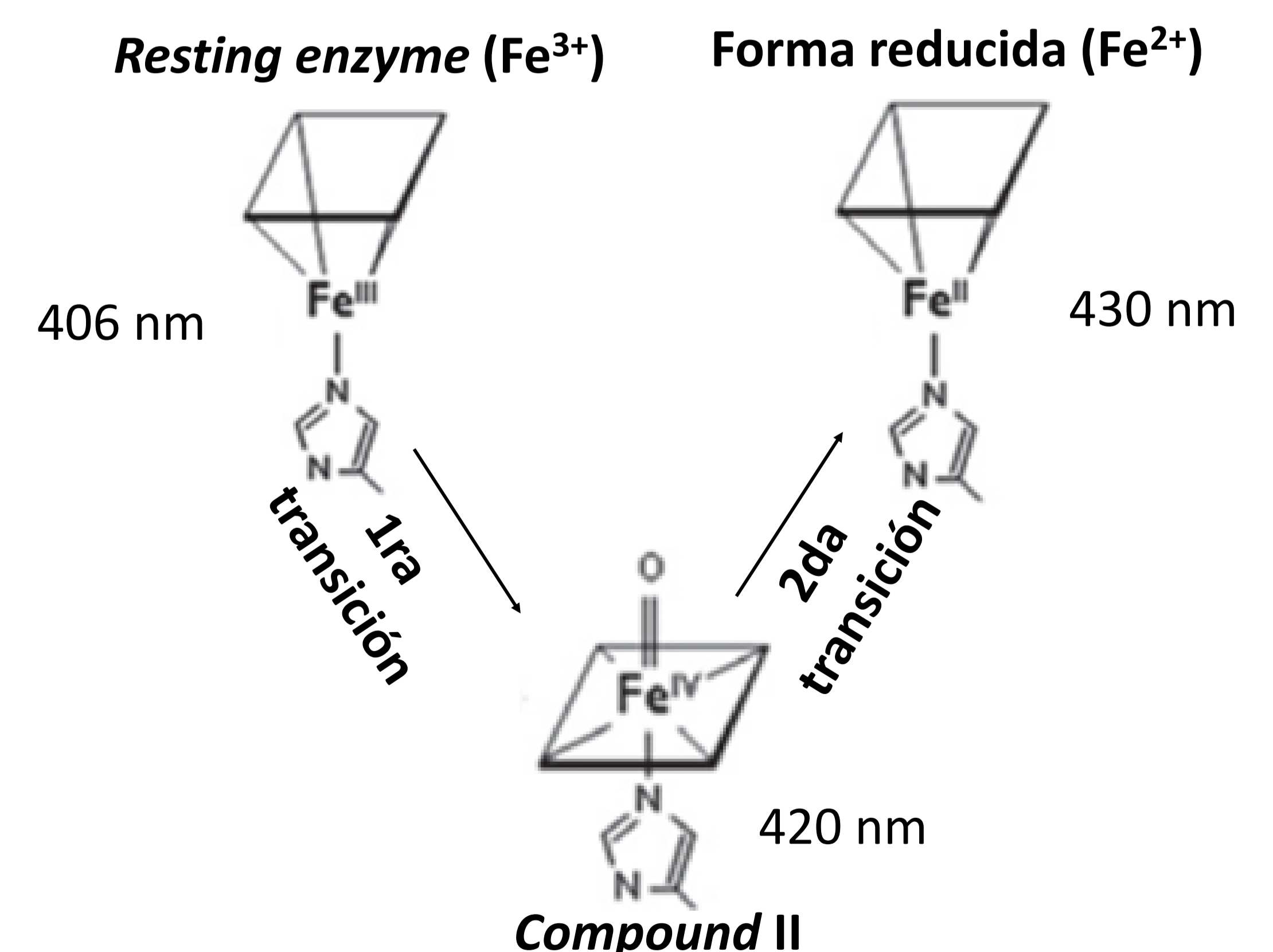
Esta especie de bajo espín puede ser atribuida a un intermediario del ciclo catalítico previamente descrito: un compuesto oxo-férrico

TITULACIÓN QUÍMICA

Realizamos una titulación química de BsDyP usando ditionito de sodio en atmósfera de Argón, monitoreando el Potencial de Circuito Abierto, los cambios en la posición de la banda Soret en UV-VIS y bandas Raman Resonantes del hemo.



Proponemos un posible proceso que explique la curva de titulación obtenida



CONCLUSIONES...

- Observamos mediante RR y UV-VIS la formación de una especie **6cLS** cuando se aplica potencial reductor.
- Obtuvimos los mismos resultados al utilizar un agente reductor químico (ditionito de sodio). Además, al continuar agregando mayores cantidades de ditionito logramos reducir el hemo, obteniendo el estado ferroso alto espín.
- Proponemos que la especie **6cLS** podría ser *Compound II*, un intermediario del ciclo catalítico.

Y PERSPECTIVAS

- Realizando espectroelectroquímica con detección EPR nos permitiría confirmar la identidad de la especie **6cLS** formada mediante ambas titulaciones. Además, nos permitiría identificar el mecanismo mediante el que esta especie oxo-férrica se forma.
- Luego de confirmar la identidad de la especie **6cLS**, sería crucial realizar una caracterización completa de parámetros termodinámicos y cinéticos de la formación de esta especie para ganar conocimiento sobre el ciclo catalítico de DyPs.