

DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA Y QUÍMICA DE LA HISTIDÍN AMONIO LIASA DE *GEOBACILLUS KAUSTOPHILUS*

R. Gutiérrez, B. Pacheco, D. Rodríguez, F. Rodríguez-Vico, L.M. Contreras-Moyeja, J.M. Clemente-Jiménez y F.J. Las Heras-Vázquez.

Área de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Química y Física, Facultad de Ciencias Experimentales, ceiA3, Universidad de Almería

INTRODUCCIÓN

La enzima histidín amonio liasa (HAL, EC 4.3.1) cataliza la primera reacción del catabolismo del aminoácido histidina transformando la L-histidina en ácido *trans*-urocánico (Figura 1). Aunque la importancia fisiológica, la regulación de su síntesis, la actividad enzimática y detalle estructural de las HAL de origen microbiano se conocen muy bien, poco se conoce sobre su estabilidad y los mecanismos de desplegamiento. La enzima HAL es un homotetrámero (Figura 2) con 509 aminoácidos por monómero con una inusual alta temperatura de fusión de 83 °C incluso en enzimas de organismos mesófilos¹. En el presente trabajo se ha estudiado la estabilidad estructural frente a cambios de pH, temperatura y agentes desnaturalizantes para la enzima HAL de *Geobacillus kaustophilus* (GkHAL) a través de ensayos de actividad enzimática, Dicroísmo Circular (CD) y Fluorescencia en el estado estacionario. A pesar que las desnaturalizaciones térmica y química de GkHAL fueron irreversibles, impidiendo caracterizar termodinámicamente el proceso, sí pudo determinarse la energía de activación (E_a) del proceso cinético de la desnaturalización térmica de GkHAL.

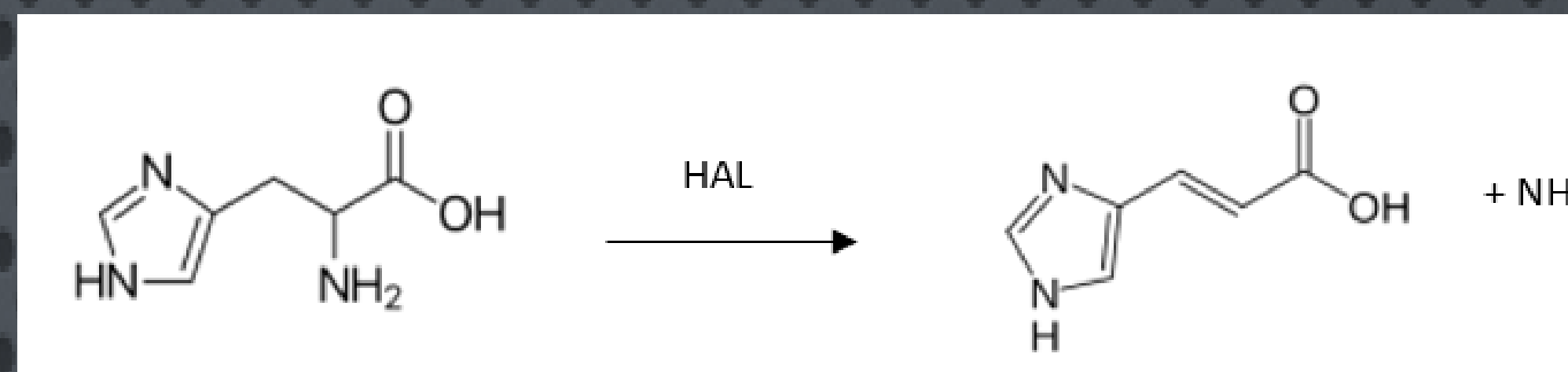


Figura 1. Reacción catalizada por la histidín amonio liasa.

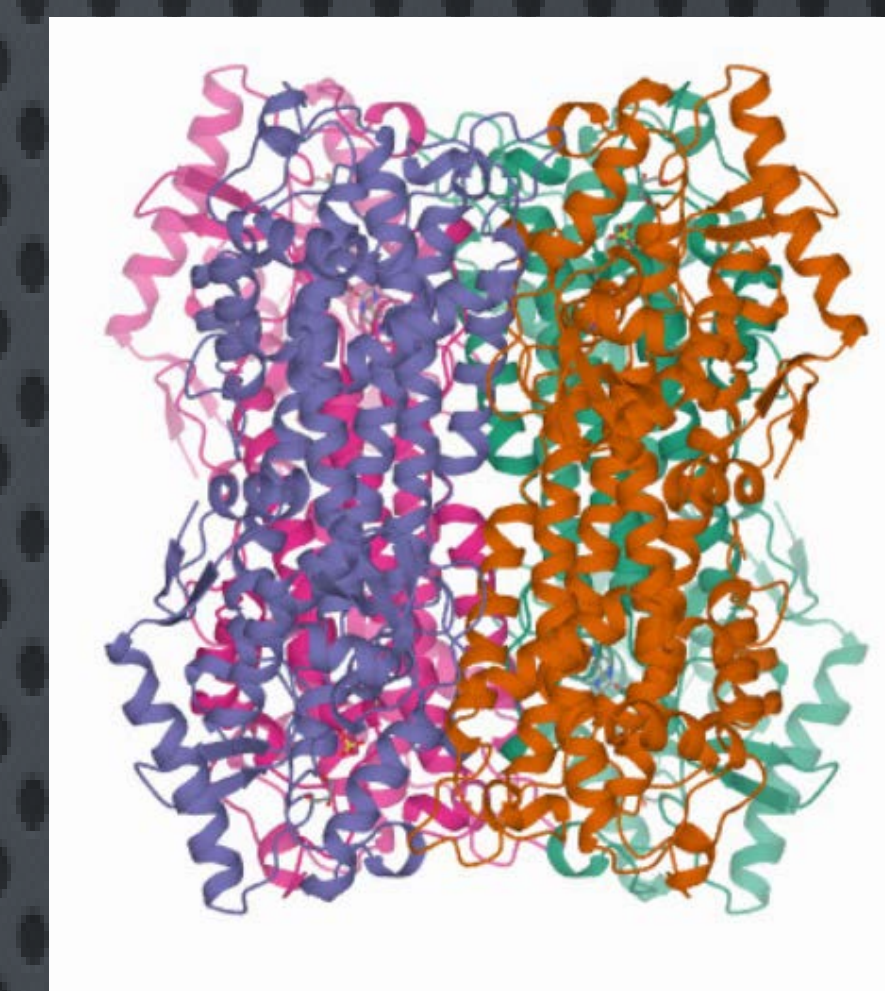


Figura 2. Estructura cristalina por rayos X de PpHAL. PDB (1B8F).

RESULTADOS

Caracterización enzimática de GkHAL. La máxima actividad de GkHAL se presentó a pH 8 y a 85 °C (Figura 3, panel A y B). Respecto a la estabilidad térmica catalítica de GkHAL (Figura 3C), la $t_{1/2}$ a la cual pierde un 50% de su actividad fue de 83,5 °C, poniendo en evidencia el carácter termófilo de la misma.

Estructura y cambios conformacionales de GkHAL inducido por pH. Los experimentos de fluorescencia en el estado estacionario y el dicroísmo circular permitieron registrar los cambios en la estructura terciaria y secundaria de GkHAL. El máximo de emisión del espectro de fluorescencia de GkHAL a pH 8 se centró a 340 nm, sugiriendo que la fluorescencia de la proteína está dominada por la emisión de los residuos de Trp (Figura 4A). La dependencia de la energía promedio de la fluorescencia con el pH define una curva con una transición a pHs entre 3 y 4 (Figura 4B) con una fase de estabilización de la conformación entre pH 6,5 y 9. La enzima GkHAL a los pH de mayor actividad muestra un espectro de CD con mínimos a 208 y 222 nm, los cuales son característicos de una proteína con alto contenido helicoidal. La elipticidad a 222 nm a pH muy ácidos o básicos disminuye abruptamente (valores más positivos) mientras que a pH 8 es mínima (valor más negativo) sugiriendo un mayor contenido helicoidal al pH de máxima actividad (Figura 4D). En resumen se puede indicar que GkHAL está correctamente plegada entre pH 7 y 9.

Desnaturalización térmica y química de GkHAL. GkHAL a pH 8 se desnaturaliza térmicamente de forma irreversible impidiendo el análisis termodinámico de la reacción de plegamiento. La desnaturalización térmica fue independiente de la concentración de la proteína (Figura 5A) pero dependiente de la velocidad del barrido (Figura 5B). Gracias a esta última dependencia se pudo determinar la energía de activación (E_a) del proceso cinético de desnaturalización irreversible siguiendo el método desarrollado por Sánchez-Ruiz *et al.*², que asume un proceso irreversible en dos estados que están relacionados por una constante de primer orden que cambia con la temperatura de acuerdo con la ecuación de Arrhenius. A partir del plot de Arrhenius se obtuvo una E_a de 213 ± 12 kJ mol⁻¹ para la desnaturalización de GkHAL (Figura 5C). Finalmente se intentó calcular la estabilidad de la GkHAL mediante desnaturalización química. Como ocurrió con la desnaturalización térmica, la química también fue irreversible observándose histéresis en el ciclo de desnaturalización.

Figura 3. Estudio enzimático de GkHAL.

(A) Efecto del pH sobre la actividad, (B) Efecto de la temperatura sobre la actividad, (C) Termoestabilidad de GkHAL.

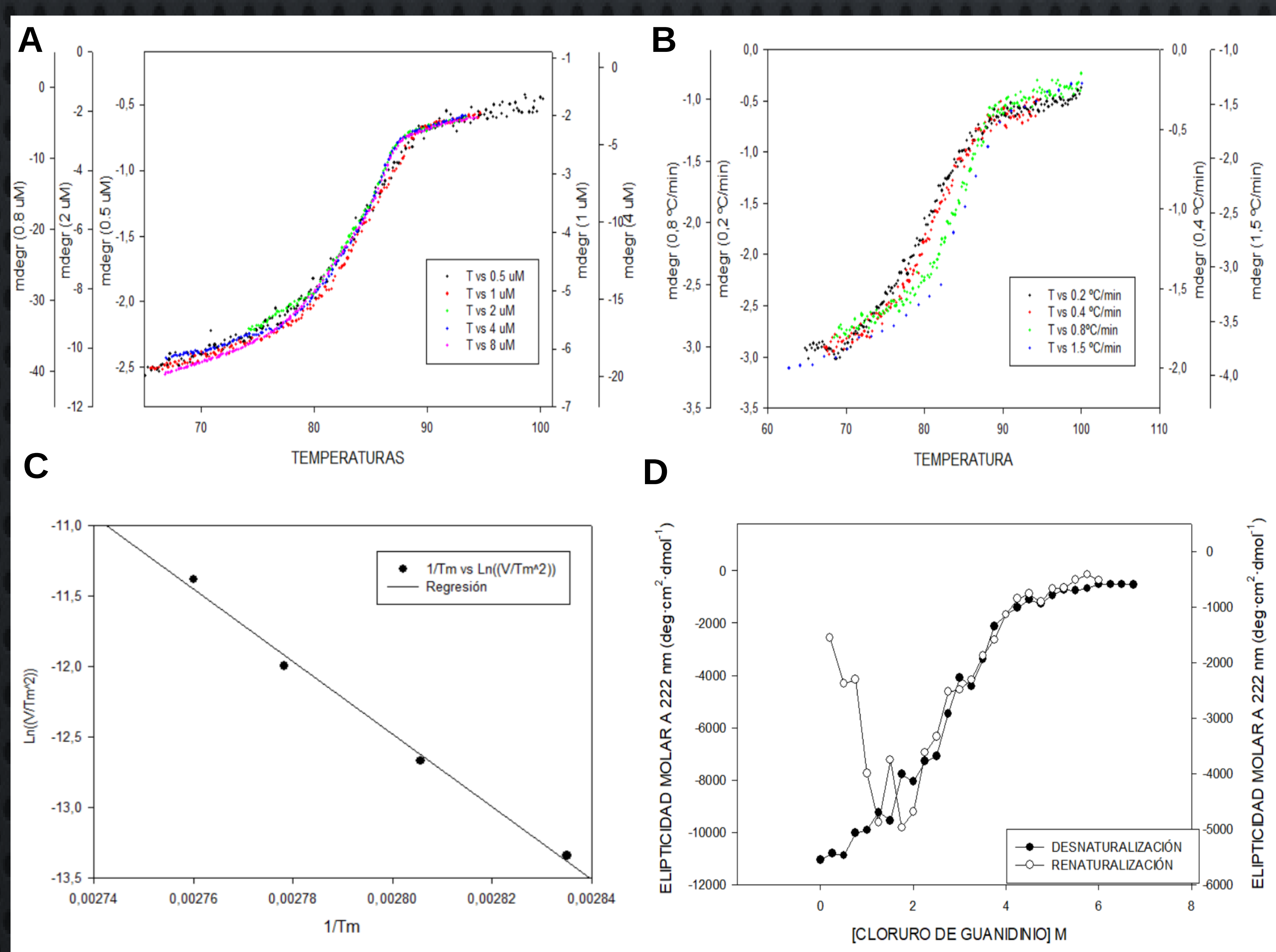
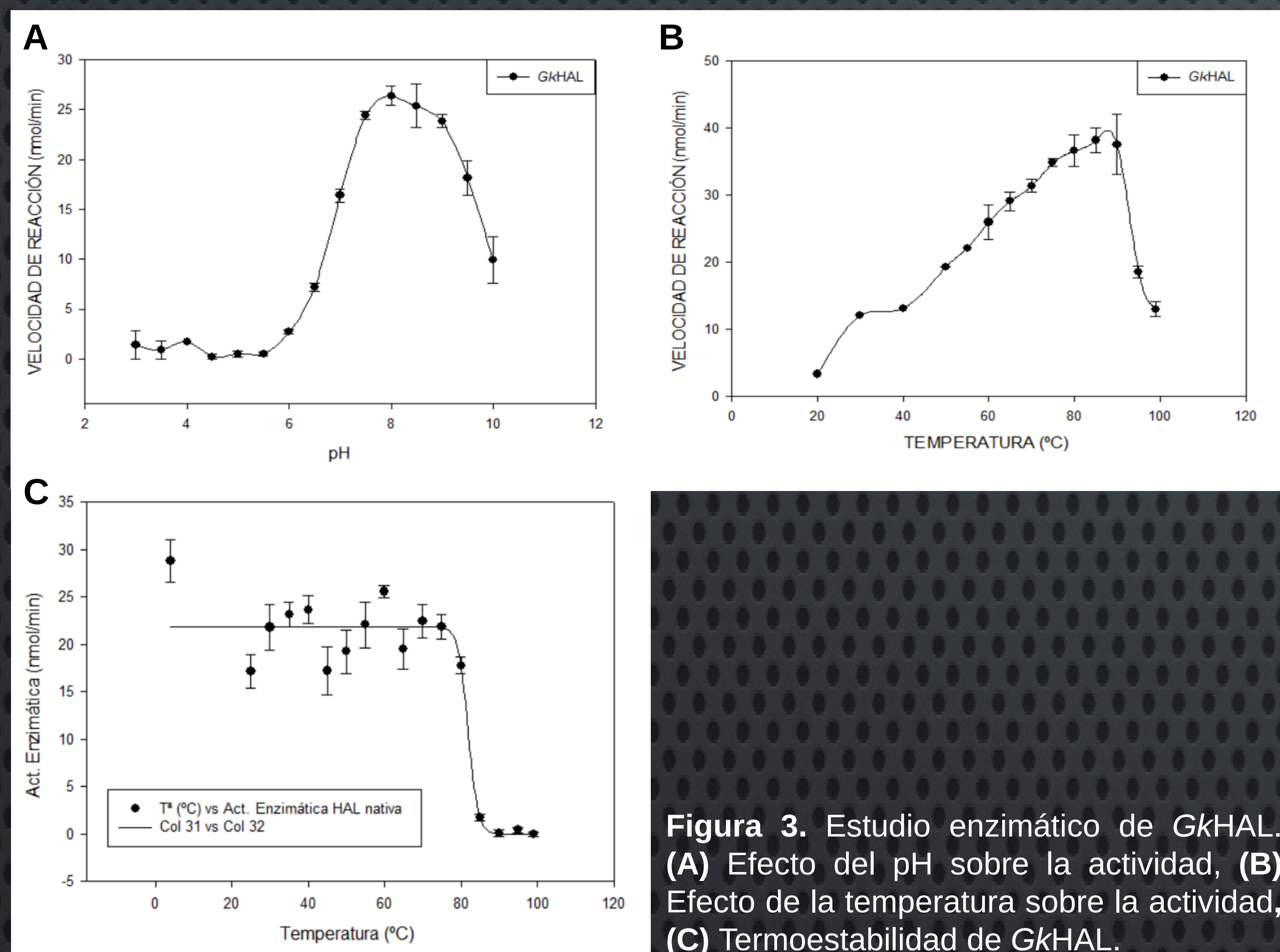


Figura 5. (A) Desnaturalización térmica a distintas concentraciones de GkHAL, (B) Desnaturalización térmica de GkHAL a diferentes velocidades de barrido, (C) Plot de Arrhenius, (D) Desnaturalización y renaturalización química de GkHAL.

REFERENCIAS

- M. Langer, G. Reck, J. Reed, J. Retey, *Biochemistry*, **1994**, 33, 6462–6467.
- J.M. Sánchez-Ruiz, J.L. López-Lacomba, M. Cortijo, P.L. Mateo, *Biochemistry*, **1988**, 27, 1648-1652

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado a través de los proyectos UAL18-CTS-B032-A y PPUENTE2020/006.

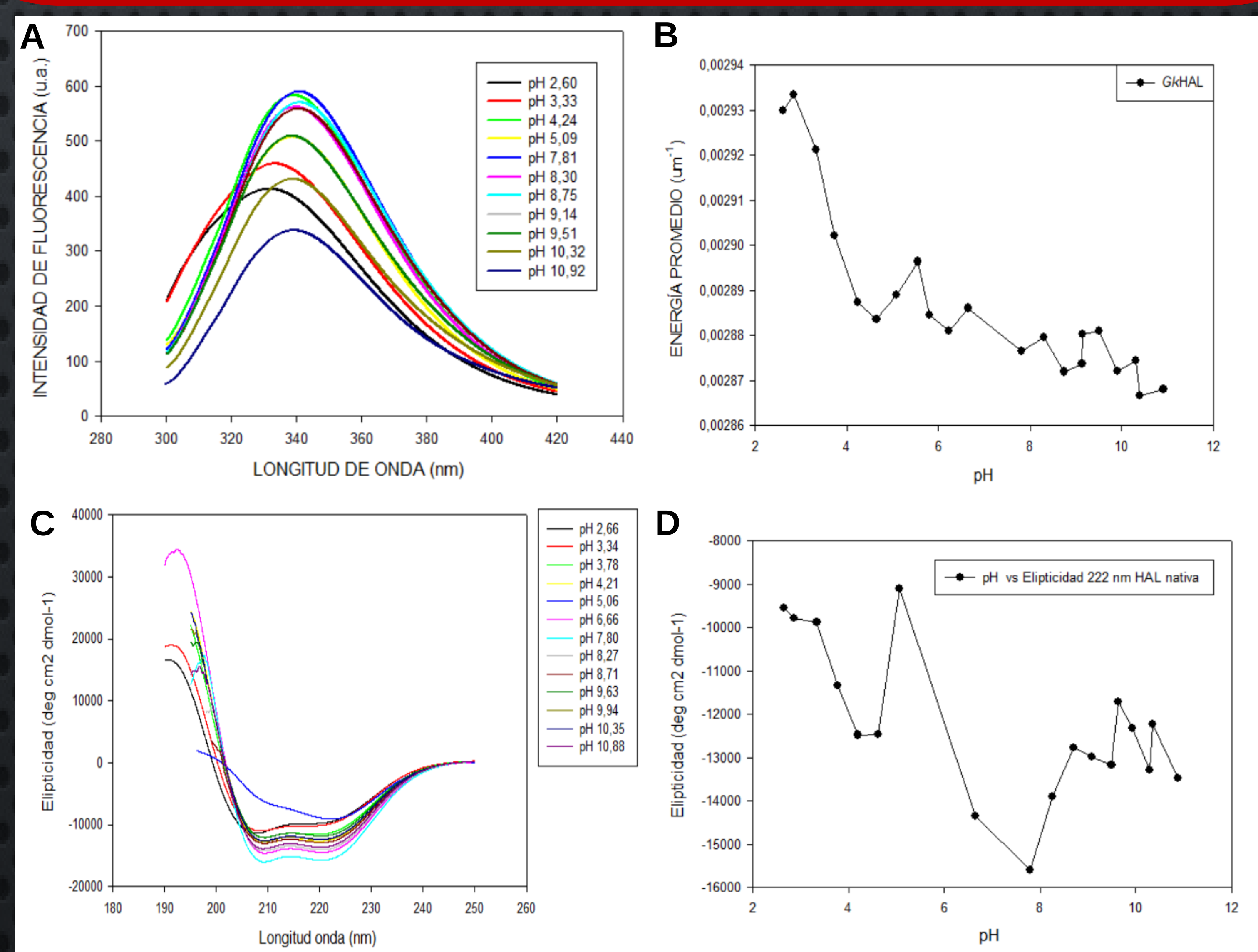


Figura 4. Cambios conformacionales de GkHAL en función del pH. (A) Espectros de fluorescencia en estado estacionario, (B) Energía promedio en función del pH, (C) Espectros de CD a diferentes pH. (D) Elipticidad molar a 222 nm en función del pH.

CONCLUSIONES

- GkHAL es una enzima termófila capaz de funcionar a altas temperaturas y en rango amplio de pH (6-9), con una alta termoestabilidad. Esta última característica la hace atractiva para aplicaciones industriales.
- La estructura secundaria de GkHAL se ve afectada por el pH con dos conformaciones diferentes, una a pH ácido 2-3 y otra a pH 4-11, estando plegada entre pH 7-9, en correspondencia con el rango de pH donde muestra su máxima actividad.
- La histéresis debido a la no equivalencia de los mecanismos de despliegue y replegado evidencia que estos procesos son demasiado lentos para permitir que se establezca el equilibrio dentro de los tiempos experimentales de incubación.