



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y
BIOPROCESOS**

**Z_o PEROXIDASA: MECANISMO DE REACCIÓN DE
UNA PEROXIDASA INTRÍNICAMENTE ESTABLE AL
PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.**

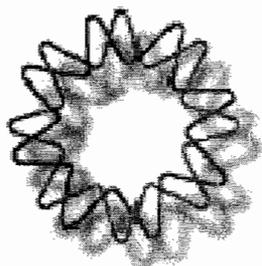
T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

PALOMA COLUMBA GIL RODRÍGUEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. BRENDA VALDERRAMA BLANCO



CUERNAVACA, MOR

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos

A la Dra. Brenda Valderrama por todo lo que me ha enseñado, por su paciencia y por brindarme siempre su apoyo.

Al Dr. Eduardo Horjales y al Dr. Rafael Vázquez por permitirme realizar este trabajo en sus laboratorios.

A los miembros del Jurado: Dr. Rosario Muñoz Clares, Dra. Adela Rodríguez Romero, Dr. Sergio Encarnación Guevara y Dr. Humberto García Arellan, por sus comentarios para poder realizar un mejor trabajo.

A la Biol. Rosa Román, al M.C. Raunel Tinoco y a la Biol. Sonia Rojas, por el apoyo técnico durante mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos por todos los buenos momentos que me han brindado.

A CONACYT por la beca otorgada.

Este proyecto fue financiado por el programa de apoyos a proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT) de la UNAM (IN202305-2).

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE:

FECHA:

FIRMA:

Índice general

ÍNDICE GENERAL-----	III
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS-----	V
1. RESUMEN -----	1
2. INTRODUCCIÓN -----	2
2.1 Grupo prostético de las hemo peroxidasas.-----	4
2.2 Clasificación estructural de las hemo peroxidasas-----	7
2.3 Estructura de las hemo peroxidasas de la clase III-----	9
2.4 Glicosilaciones y sitio de unión de calcio en hemo peroxidasas del tipo III-----	11
2.5 Papel fisiológico de las hemo peroxidasas de plantas -----	13
2.6 Mecanismo catalítico de las hemo peroxidasas. -----	14
2.6.1 Formación del Compuesto I-----	16
2.6.2 Reducción de los Compuestos I y II al estado basal-----	18
2.7 Parámetros catalíticos -----	20
2.8 Mecanismo de inactivación-----	21
2.9 Espectrometría de masas-----	23
3. HIPÓTESIS -----	24
4. OBJETIVO -----	24
4.1 Objetivos particulares -----	24
5. MÉTODOS -----	25
5.1 Purificación-----	25
5.2 Determinación del peso molecular por cromatografía de exclusión molecular.-----	27
5.3 Digestión del gel SDS-PAGE con tripsina y espectrometría de masas.-----	27
5.4 Estabilidad de ZoPrx ante el H ₂ O ₂ -----	29
5.5 Producción de Oxígeno-----	29
5.6 Perfil de estabilidad a diferentes pHs -----	30

5.7	<i>Parámetros catalíticos</i>	30
5.8	<i>Identificación de especies catalíticas.</i>	31
6.	RESULTADOS	32
6.1	<i>Purificación e identificación</i>	32
6.2	<i>Espectrometría de masas y análisis de los péptidos identificados</i>	35
6.3	<i>Asignación de homólogos de ZoPrx</i>	40
6.4	<i>Estabilidad de ZoPrx ante el peróxido de hidrógeno</i>	42
6.4.1	<i>Cinética de inactivación</i>	42
6.4.2	<i>Estabilidad bajo condiciones de operación</i>	43
6.4.3	<i>Estabilidad oxidativa en función de la relación $[H_2O_2]/[E]$.</i>	45
6.4.4	<i>Monitoreo del grupo hemo en presencia de H_2O_2</i>	45
6.5	<i>Estimación de la actividad endógena de catalasa por evolución de oxígeno molecular</i>	47
6.5.1	<i>Parámetros catalíticos</i>	49
6.5.2	<i>Determinación de constantes de velocidad</i>	50
6.6	<i>Identificación espectroscópica de las especies catalíticas</i>	50
7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	53
8.	CONCLUSIONES	55
9.	PERSPECTIVAS	57
10.	EPÍTOMES	58
11.	BIBLIOGRAFÍA	59

Índice de figuras y tablas

Fig. 1 Esquema de los diferentes grupos hemo.	5
Fig. 2 Grupo Hemo b pentacoordinado	7
Fig. 3 Estructura tridimensional de HRP C	9
Fig. 4 Esquema de las estructura de las hemo peroxidasas.	10
Fig. 5 Sitios de unión al calcio distal y proximal de HRP C.....	12
Fig. 6 Mecanismo del ciclo catalítico de las hemo peroxidasas	15
Fig. 7 Sitio activo de HRP C	16
Fig. 8 Formación del Compuesto I	18
Fig. 9 Mecanismo de oxidación del substrato.....	19
Ecuación 2 velocidad de reacción de Michaelis-Menten	20
Fig. 10 Esquema básico del ciclo de las peroxidasas [11].	20
Fig. 11 Mecanismo propuesto de inactivación por H ₂ O ₂	22
Fig. 12 Banda Soret de ZoPrx.....	34
Fig. 13 Gel de isoelectroenfoque.	34
Fig. 14 SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie.	35
Fig. 15 Espectro del péptido 729.5 D	37
Fig. 16 Espectro del péptido 853.5 Da	38
Fig. 17 Espectro del péptido 1005.6 Da	38
Fig. 18 Espectro del péptido 2247.8 Da	39
Fig. 19 Espectro del glicopéptido.....	39
Fig. 20 Comparación de las secuencias parciales de aminoácidos	41
Fig. 21 Cinética de inactivación	43
Fig. 22 Número total de recambio	44
Fig. 23 Dependencia de la inactivación a la concentración de H ₂ O ₂	45
Fig. 24 Monitoreo del espectro de la banda Soret.....	46
Fig. 25 Producción de oxígeno	48
Fig. 26 Tiempo de vida media a diferentes pHs.....	49
Fig. 27 Monitoreo del espectro del ciclo catalítico.....	51
Fig. 28 Esquema de la cinética del ciclo catalítico	52

Tabla 1 <i>Características de las superfamilias de las hemo peroxidasas.</i>	7
Tabla 2 <i>Resumen de purificación de la ZoPrx.</i>	33
Tabla 3. <i>Parámetros catalíticos</i>	49
Tabla 4. <i>Constantes de velocidad del ciclo catalítico</i>	50

1. Resumen

Las hemo peroxidasas son un grupo de hemo proteínas capaces de catalizar la oxidación de una gran variedad de compuestos a través de la reacción con peróxido de hidrógeno. A pesar de su gran versatilidad, sus aplicaciones como biocatalizadores están limitadas por su pérdida de actividad ante el peróxido de hidrógeno.

La búsqueda sistemática de una hemo peroxidasa que presentara una estabilidad intrínseca ante el peróxido de hidrógeno, nos llevó a encontrar en el extracto de rábano japonés (*Raphanus sativus* L. var. Daikon s) una isoforma altamente estable al peróxido de hidrógeno, la cual llamamos Zo peroxidasa (ZoPrx), por la palabra griega que significa permanente.

La ZoPrx se identificó como hemo peroxidasa por la presencia de una banda de absorción típica de las hemo proteínas a 403 nm (Soret) y un Rz de 3.2. Es un monómero con su punto isoeléctrico a pH 4, y tiene un peso molecular de 47 kDa.

La secuencia parcial de la ZoPrx muestra gran similitud con las hemo peroxidasas aniónicas de *Armoracia rusticana* y *Arabidopsis thaliana* (HRPA2 y ATPrA2 respectivamente). Debido a la similitud con la ZoPrx y disponibilidad comercial se tomó como referencia a HRPA2 para su caracterización cinética, así como para el análisis del efecto del peróxido de hidrógeno sobre estas enzimas.

La alta estabilidad oxidativa de la ZoPrx se hace evidente al exponerla a concentraciones catalíticas de peróxido, en las que mantiene el 100% de su actividad a diferencia de otras hemo peroxidasas como la HRPA2 que son inactivadas irreversiblemente en poco minutos, a pesar del efecto de protección de su actividad de catalasa. Además de su estabilidad oxidativa, la ZoPrx presenta una actividad catalítica similar a la hemo peroxidasa comercial HRPA2. Por todas estas razones la ZoPrx puede ser tomada como un modelo de una hemo peroxidasa intrínsecamente estable para el estudio y diseño de nuevos biocatalizadores.

2. Introducción

Las enzimas son catalizadores biológicos muy eficientes que pueden llevar a cabo una gran variedad de reacciones químicas, entre las que encontramos a las oxido-reductasas, las cuales intervienen en múltiples procesos celulares y se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Entre las oxido-reductasas tenemos a las oxidasas, oxigenasas, deshidrogenasas y hemo peroxidasas. Su catálisis involucra la transferencia de electrones entre una molécula donadora y una molécula aceptora [1].

Las oxido-reductasas tienen centros activos que cambian su estado de oxidación durante el ciclo catalítico. Es frecuente que estos centros contengan metales de transición, en cuyo caso estas proteínas redox son también metalo proteínas [1]. Uno de los centros activos redox más comunes en las metalo proteínas es el grupo hemo, constituido por un anillo de porfirina que coordina al hierro.

Las hemo proteínas tienen funciones biológicas diversas. Entre ellas encontramos a las hemo peroxidasas, ampliamente distribuidas en todos los organismos vivos y capaces de catalizar una gran variedad de reacciones de oxido-reducción utilizando como sustrato al peróxido de hidrógeno, aunque también pueden usar otros alquilhidroperóxidos [2].

Las hemo peroxidasas han sido muy estudiadas debido a su gran versatilidad de funciones fisiológicas tales como la lignificación, la formación de la pared celular, la defensa contra agentes patógenos, como parte de procesos catabólicos, etc [3]. Es por esta versatilidad que es común encontrar un gran número de isoenzimas en el mismo organismo, este es el caso por ejemplo, de *A. thaliana* y *Oryza sativa* L., se han detectado 73 y 33 isogenes diferentes para hemo peroxidasas, respectivamente [4;5]

Las hemo peroxidasas tienen un gran número de aplicaciones biotecnológicas: como bioanalíticos en estuches de análisis enzimático o como biosensores enzimáticos para análisis clínicos de metabolitos, por ejemplo, la glucosa, el colesterol, los triglicéridos y el ácido úrico; también para el análisis y la síntesis estereoespecífica de algunos fenoles y anilinas utilizados como fármacos y reactivos químicos; en la elaboración de productos de panadería,

decoloración de textiles; en el proceso de blanqueado del papel, o en los detergentes domésticos, en la degradación de contaminantes; en biorreactores enzimáticos para la depuración de vertidos industriales contaminados con fenoles o con anilinas, etc. [6].

A pesar de la gran versatilidad que tienen las hemo peroxidasas, sus aplicaciones en la industria se han visto limitadas por su susceptibilidad a las condiciones y a los agentes desnaturalizantes que usualmente involucran los procesos industriales, como son solventes orgánicos, altas temperatura, pH extremos, los detergentes, los agentes oxidantes y los metales. En particular, uno de los factores limitantes más importantes para la aplicación industrial de las hemo peroxidasas es su susceptibilidad a la inactivación por el peróxido de hidrógeno [7].

El desarrollo de nuevos biocatalizadores con propiedades deseadas para uso industrial se han buscado en tres enfoques: 1) la modificación de biocatalizadores ya existentes por métodos fisicoquímicos; 2) la generación de nuevos biocatalizadores por modificación genética de los ya existentes; y 3) la búsqueda sistemática de biocatalizadores con propiedades específicas en los recursos naturales.

Las modificaciones químicas fueron los primeros métodos que se utilizaron para la manipulación de las proteínas para mejorar su función. Esto puede realizarse desde dos aproximaciones, podemos intentar la "síntesis de novo" de proteínas por métodos químicos, o bien podemos modificar las proteínas ya existentes (Inmovilización de enzimas por unión covalente, modificación con polímeros polifuncionales, entrecruzamiento con polialdehídos, etc.). En las hemo peroxidasas esta técnica ha tenido cierto éxito incrementando su estabilidad térmica y su tolerancia a solventes orgánicos, mas no incrementando su estabilidad ante el peróxido de hidrógeno.

La evolución dirigida se presenta hoy como una de las alternativas más efectivas en el desarrollo y adaptación de biocatalizadores a los requerimientos industriales. En la evolución dirigida se introducen mutaciones aleatorias en la proteína y se seleccionan sólo aquellas variantes que presentan las propiedades deseadas. Varias rondas de mutación y selección dan lugar a una colección de proteínas modificadas que presentan las características deseadas. Sin

embargo, ya que los electrones en una enzima redox como las hemo peroxidasas pueden transferirse de un centro redox de la proteína a otro a través de diferentes vías para causar daño oxidativo, es poco factible poder adaptar una hemo peroxidasa por evolución dirigida para “bloquear” las diferentes vías por las que se transfieren los electrones para causar daño oxidativo, sin causar también una disminución en su actividad, como se ha observado en el trabajo de algunos autores en el que obtiene, por esta técnica, enzimas aparentemente más estables a costa de una baja actividad catalítica [8-10].

El diseño racional de proteínas es, en contraste, una estrategia muy poderosa que se basa en nuestro entendimiento de los mecanismos moleculares. El avance en el diseño racional depende del progreso en la resolución de estructuras cristalográficas, de programas para el modelaje y de un conocimiento profundo de la relación estructura-función. Por consecuencia, el diseño racional de nuevas proteínas ha sido un proceso muy difícil de lograr, aún más cuando no se cuenta con una proteína modelo adecuada para profundizar en la relación entre la estructura y un fenómeno tan complejo como el de la inactivación de las hemo-proteínas por peróxido de hidrógeno.

Hasta ahora se han aislado y caracterizado múltiples isoperoxidasas de diferentes organismos. Al igual que en la evolución dirigida, es importante considerar el sistema de selección para aislar y caracterizar una enzima de entre la gran variedad de isoperoxidasas presentes en la naturaleza, con las propiedades deseadas. La mayoría de las hemo peroxidasas lábiles caracterizadas hasta ahora se han seleccionado con base en su abundancia y actividad catalítica, sin considerar en esta selección su estabilidad al peróxido de hidrógeno.

2.1 Grupo prostético de las hemo peroxidasas.

El grupo hemo de las peroxidasas es una ferriprotoporfirina IX en la que existen un total de ocho posiciones en los anillos pirrólicos que pueden ser ocupadas por distintos grupos funcionales, desde metilos hasta grupos propionatos. De acuerdo a la naturaleza y posición de estos substituyentes se pueden encontrar ocho clases de hemo: hemo a, hemo b, hemo c, hemo d, hemo d1, hemo o, hemo P460 y siro hemo [11] (**Fig. 1**).

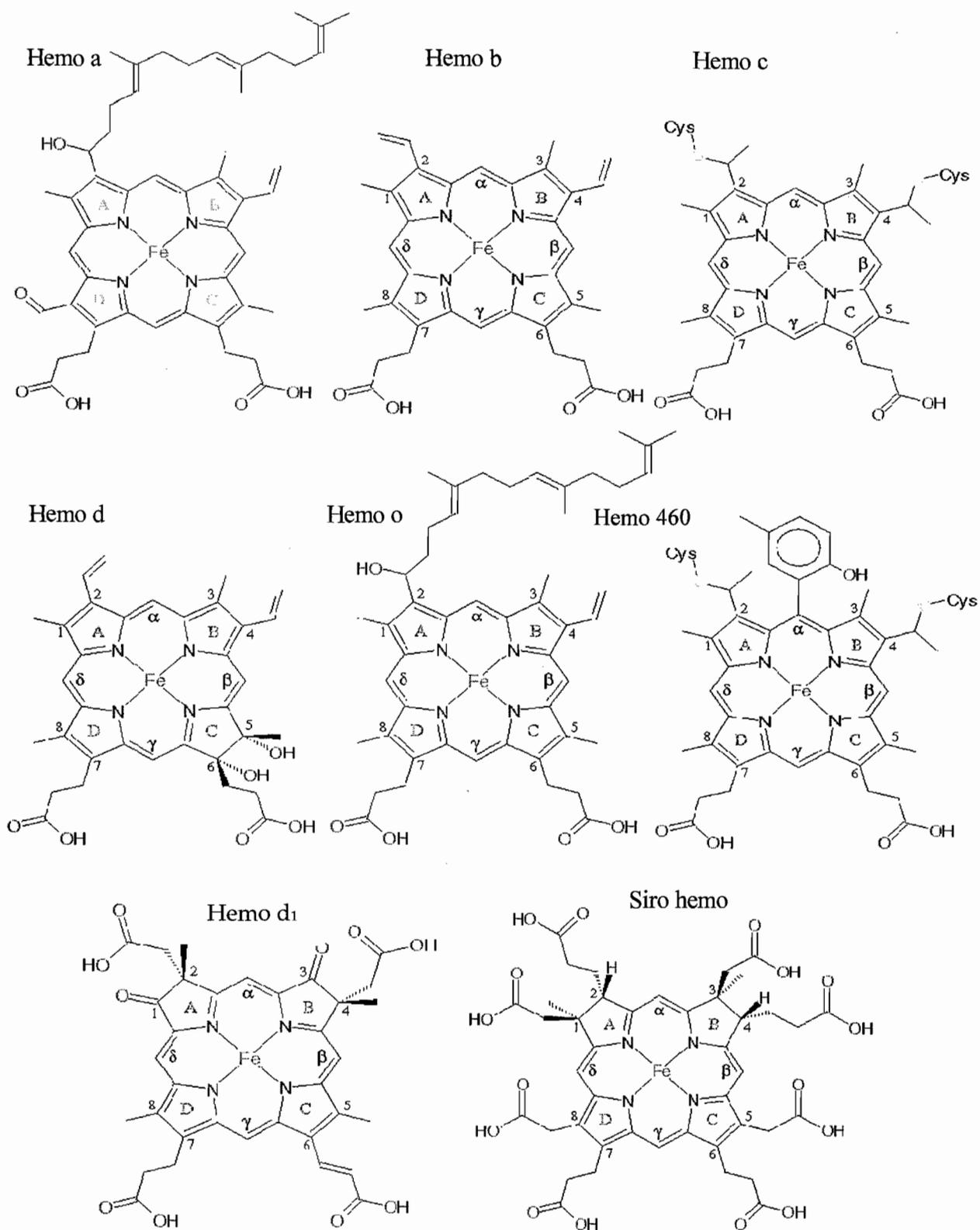


Fig. 1 Esquema de los diferentes grupos hemo.

El hemo b, presente en las hemo peroxidasas de plantas, tiene cuatro grupos metilo en las posiciones 1, 3, 5 y 8, dos grupos vinilo en las posiciones 2 y 4 y dos propionato en las posiciones 6 y 7. La nomenclatura IUPAC de esta porfirina es 1,2,5,8-tetrametil-2,4-divinilporfirina-6,7 ácido dipropiónico (**Fig. 1**, hemo b). La clase de hemo contenida en una hemo-proteína es característica, por ejemplo, las hemo peroxidasas de plantas y las catalasas contienen un hemo b, mientras que el citocromo c contiene un hemo c (**Fig. 1**) [11].

Mientras que en la mayoría de los complejos inorgánicos el hierro se encuentra hexacoordinado, en las enzimas el Fe^{III} está comúnmente pentacoordinado. En particular, en las hemo peroxidasas las posiciones de coordinación 1-4 del Fe^{III} son ocupadas por los cuatro átomos de nitrógeno de cada pirrol, funcionando éstos como ligantes ecuatoriales, así que la carga neta del complejo hemo con el hierro tetracoordinado es +1. La posición de coordinación 5 está localizada sobre el lado proximal del hemo y en las hemo peroxidasas de plantas está comúnmente ocupada por el grupo imidazol de un residuo de histidina (**Fig. 2**). Este quinto ligando confiere al grupo hemo un alto spin y es un modulador de la reactividad [12].

La posición de coordinación 6 está localizada sobre el lado distal del hemo, y aunque en la mayoría de las hemo proteínas está vacante, en algunas peroxidasas como en el citocromo c el Fe^{III} interactúa con el azufre de una metionina, quedando hexacoordinado o en el caso de la citocromo c peroxidasa (CcP) por una molécula de agua. La cavidad distal es la región en la que ocurren muchas de las reacciones de las hemo peroxidasas.

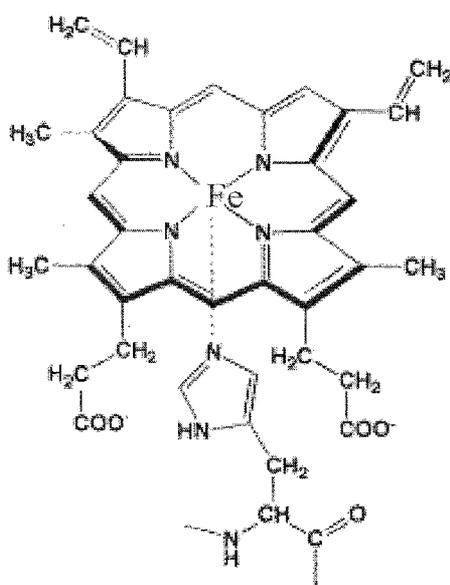


Fig. 2 Grupo Hemo b pentacoordinado

2.2 Clasificación estructural de las hemo peroxidasas

La relación evolutiva entre las múltiples isoformas de peroxidasa en plantas inferida por Karen Welinder permitió su clasificación en tres diferentes superfamilias (**Tabla 1**) [13].

Tabla 1 Características de las superfamilias de las hemo peroxidasas.

	Clase I EC 1.11.1.56.11	Clase II EC 1.11.1.13.14	Clase III EC 1.11.1.7
Organismo	Peroxidasas intracelulares de plantas, levaduras y bacterias	Extracelulares de hongos	Secretadas por plantas
Ejemplo	Citocromo C peroxidasa Ascorbato peroxidasa, Peroxidasas bacterianas	Lignino peroxidasa Manganeso peroxidasa Cloroperoxidasa	Peroxidasa de rábano blanco, arroz, <i>A. thaliana</i> , etc.
Puentes disulfuro	Ausentes	4	4
Glicosilación	Ausente	Hasta 5 %	Hasta 30 %
Iones calcio	Ausentes	2	2

La clase I de peroxidasas incluye a la citocromo c peroxidasa de levadura, a la ascorbato peroxidasa de plantas y la catalasa-peroxidasa bacteriana. Estas peroxidasas no están glicosiladas, no tienen puentes disulfuros ni iones calcio, no cuentan con péptido señal para secreción y cuentan con un residuo proximal de Trp 191 (en CcP) conservado.

En la clase II de peroxidasas secretadas por hongos tenemos como ejemplos las lignino y manganeso peroxidasas de *Phanerochaete chrysosporium* y la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*. Esta superfamilia tiene en el amino terminal un péptido señal para secreción por el retículo endoplásmico. Poseen cerca del 5 % de carbohidratos, dos iones calcio y cuatro puentes disulfuro conservados. El residuo proximal Trp, conservado en la clase I, es remplazado por Phe o Ile.

La clase III de peroxidasas secretadas por plantas tiene dos iones calcio, un péptido señal para secreción, cuatro puentes disulfuro conservados, ubicados en regiones diferentes a la clase II, una hélice adicional que participa en el acceso de sustrato al hemo y un porcentaje de carbohidratos que va de 0 a 30 %.

La estructura de estas hemo peroxidasas está formada predominantemente por α -hélices y una pequeña región β -plegada. Las 10 hélices (A-J) ocupan una posición topológica similar entre los miembros de una superfamilia. En todas las familias el grupo hemo está localizado entre la hélice B y F. Las clases I y II presentan una hélice adicional B' entre la hélice B y C. En la clase III no se encuentra la hélice B' pero presenta tres hélices adicionales, D', F' y F'' [11].

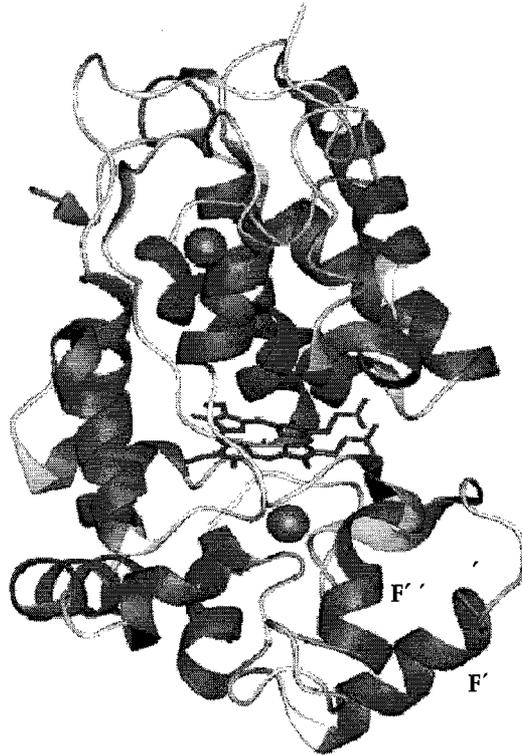


Fig. 3 Estructura tridimensional de HRP C. Se indica las posiciones de las α -hélice F' y F''. [14]

2.3 Estructura de las hemo peroxidasas de la clase III

Las hemo peroxidasas de plantas están compuestas de una sola cadena polipeptídica de aproximadamente 300 amino ácidos, un grupo hemo (protoporfirina IX hierro [III]) , dos moléculas de calcio y varios sitios de glicosilación [11;14-16].

La estructura primaria de las hemo peroxidasas es altamente variable entre las isoenzimas de una misma especie, que llegan a ser tan divergentes que conservan sólo el 30% de identidad. Sin embargo, se encuentra hasta más del 90% de similitud entre la misma isoenzima en diferentes especies, como es el caso de la ATP A2 y la HRP A2, que presentan una similitud del 95% [17]. Esta observación sugiere que diferentes especies de plantas poseen un grupo de hemo peroxidasas con características similares.

Las hemo peroxidadas de la clase III adoptan estructuras muy similares. Están conformadas por tres regiones altamente conservadas: la región distal (arriba del hemo) que es parte fundamental de la catálisis, una región proximal (abajo del hemo), que pentacoordina al grupo hemo, y una región central muy conservada de la cual no está definida su función [18]. Presentan cierta identidad en el N-Terminal, en contraste con la región C-Terminal con mayor variabilidad (Fig. 4) [18]. Contienen 8 Cys formando cuatro puentes disulfuro Cys 11-Cys 91, Cys 44-Cys 49, Cys 97-Cys 301, Cys 177-Cys 209 (en HRPC). También dos sitios de unión a calcio, uno en el dominio distal y otro en el dominio proximal y un puente salino entre Asp 99-Arg 123 que se ha encontrado en todas las hemo peroxidadas.

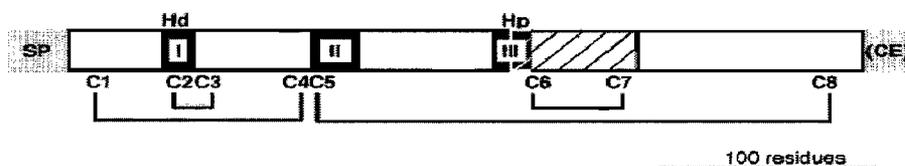


Fig. 4 Esquema de la estructura de las hemo peroxidadas. Péptido señal (SP), C-terminal (CE), Las regiones conservadas se representan en la zona negra, el dominio catalítico del lado distal al hemo (I), el enlace proximal al hemo (II), y un dominio central conservado (III). Una región variable en la zona rayada, se señalan dos histidinas invariables de las regiones distal (Hd) y proximal (Hp) y las ocho cisteínas (C1 a C8) indicando los puentes disulfuros [18].

Un factor que distingue a las hemo peroxidadas de la clase III de las de las clases I y II es la presencia de hélices adicionales (hélices D, F', F''). Las hélices F' y F'' se encuentran entre el sitio del enlace proximal del hemo y el residuo invariable Cys 44 (en HRP) Fig. 3 [19]. En esta región, delimitado por las hélices F y G, se encuentra un fragmento variable en secuencia y longitud, que puede ser usado para distinguir a hemo peroxidadas homólogas [18]. En estos fragmentos se encuentra un puente disulfuro y dos prolinas muy conservadas que limitan la variabilidad de conformaciones estructurales.

2.4 Glicosilaciones y sitio de unión de calcio en hemo peroxidasas del tipo III

Las hemo peroxidasas de plantas están altamente glicosiladas llegando a representar hasta el 30 % de su masa. En la HRPC se encuentran 8 puntos de glicosilación con un patrón de secuencia Asn-X-Ser/Thr (donde X es cualquier aminoácido) [3].

Los dos sitios de unión a calcio y los cuatro puentes disulfuro presentes en las hemo peroxidasas de la clase II y III son elementos estructurales importantes relacionados a la actividad enzimática. Se ha demostrado que eliminar un sólo calcio produce una importante disminución en la actividad, hasta de un 40%. Aún más, cuando los dos calcio son removidos, la enzima pierde completamente su actividad [16;20;21].

Los sitios de unión a calcio están localizados en la región distal y en la proximal, unidos mediante una red de puentes de hidrógeno. Cada calcio se encuentra heptacoordinado por los carbonilos de la cadena principal y de las cadenas laterales más una molécula de agua en el caso del sitio distal. En HRP C el sitio de unión distal está formado por siete átomos de oxígeno, tres de ellos de la cadena principal (Asp 43, Val 46 y Gly 48), tres de las cadenas laterales (Asp 43, Asp 50 y Ser 52) y una molécula de agua. En el sitio proximal, el sitio de unión se conforma por cuatro oxígenos de la cadena principal (Thr 171, Thr 225 e Ile 228) y tres de las cadenas laterales (Thr 171, Asp 222, Thr 225 y Asp 230) (Fig. 5). Los calcio están acoplados a residuos del sitio activo distal y proximal (en HRPC His42 y His170 respectivamente) a través de residuos adyacentes en la secuencia (en HRPC Asp43 y Thr171, respectivamente). Cada uno de estos residuos tiene dos enlaces a su correspondiente calcio, es por eso que la pérdida de cada calcio tiene repercusiones importantes en la estructura del sitio activo [16;21].

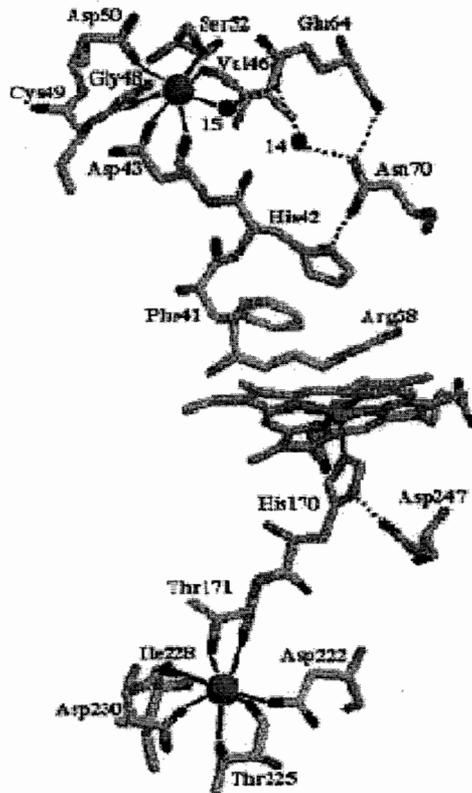


Fig. 5 Sitios de unión al calcio distal y proximal de HRP C [21].

Los diversos factores estructurales de las hemo proteínas en general hacen que puedan llevar a cabo una enorme variedad de funciones, gracias en gran medida a la extraordinaria versatilidad que le confiere la interacción de su grupo prostético con los aminoácidos de la proteína. Esta versatilidad está determinada principalmente por tres factores que influyen en el potencial de oxido-reducción del hemo. En primer lugar, los grupos que se encuentran ocupando las posiciones en los pirroles tienen un efecto sobre dicho potencial. El segundo factor es la identidad de los ligantes que interactúan con el átomo de hierro una vez que el grupo hemo se encuentra dentro de la proteína. Usualmente, los aminoácidos que llevan a cabo esta interacción son metionina, cisteína, histidina y en ocasiones tirosina. Todos estos aminoácidos poseen como característica común una cadena lateral de carácter electrodonador. El tercer factor determinante es el ambiente que rodea al grupo hemo, ya que en última instancia, ésta es la única diferencia entre hemo proteínas que poseen una misma clase de

hemo. Gracias a estos factores, dentro de esta familia de proteínas, existen variantes con rango de potencial redox de -0.2 hasta +0.5 volts [12].

2.5 *Papel fisiológico de las hemo peroxidasas de plantas*

Las hemo peroxidasas son unas de las enzimas más versátiles, ligadas a múltiples procesos fisiológicos, sin embargo, por esta versatilidad en su actividad y la gran variabilidad en los organismos, no es fácil identificar que isoforma en particular participa en una función específica.

Dentro del ciclo activo de las hemo peroxidasas se han caracterizado dos variantes, el peroxidativo y el hidroxílico. Aparentemente cada ciclo capacita a la enzima para desempeñar diferentes funciones en el organismo, ya sea generando especies reactivas de oxígeno (ROS: $\bullet\text{OH}$, $\text{HOO}\bullet$), polimerizando componentes de la pared celular o regulando los niveles de peróxido de hidrógeno [3].

Las hemo peroxidasas participan en la activación de compuestos fenólicos monoméricos para formar polímeros como la lignina, siendo ésta la función más probable en plantas, tal como se ha descrito para las isoenzimas de tabaco TP60, la hemo peroxidasa aniónica de *A. rusticana* (HRPA2), de *A. thailiana* (ATPrx53) y la peroxidasa aniónicas de tomate (TPX1)[22].

Durante la etapa de crecimiento de las plantas, se ha demostrado que las hemo peroxidasas están involucradas en el proceso de extensión de la pared celular, participando en el rompimiento y reensamblaje de polímeros de xyloglucanos y en el rompimiento de puentes de hidrógeno en la celulosa.

En una gran variedad de plantas se ha purificado hemo peroxidasas entrecruzadas por enlaces entre tirosinas y también lisina (Tyr-Tyr, Tyr-Lys), formando extensas redes dándole mayor rigidez a la pared celular. [23;24].

Tienen una importante participación en el sistema de defensa, ya que se ha observado que cuando una planta está expuesta a factores de estrés la actividad de peroxidasa aumenta. Esta reacción ocurre de la misma forma ante factores bióticos, como la infección con microorganismos patógenos, abióticos como metales pesados, contaminantes industriales,

contaminación agrícola o físicos como heridas, ya sea actuando de una manera pasiva aumentando la rigidez de la pared celular o activa produciendo agentes ROS [3].

Por el gran número de isoformas involucradas en gran variedad de procesos, el incremento de la presencia de mRNA, proteína y actividad de las hemo peroxidasas a lo largo de todo el ciclo de vida de las plantas, inducido por múltiples estímulos, tales como la infección de agentes patógenos, heridas o estrés oxidativo, hace difícil la comprensión del mecanismo de regulación y expresión de la hemo peroxidasas de plantas ya que es muy heterogénea[18].

Ya que las hemo peroxidasas de la clase III desempeñan múltiples procesos fisiológicos, es común que se encuentren un gran número de isoenzimas en un mismo organismo, como por ejemplo en *A. thaliana* y en *Oryza sativa* L.a, en la que se han detectado 73 y 33 genes que codifican para hemo peroxidasas [4;5].

Además de la diversidad de isoformas de hemo peroxidasas, también se observa una heterogeneidad en su susceptibilidad a ser oxidadas por el peróxido. Comparando la vida media de varias hemo peroxidasas después de haber sido expuestas a concentraciones catalíticas de peróxido de hidrógeno, vemos que van desde unos pocos minutos, como en el caso de la Lignino-peroxidasa (*P. chrysosporium*) con una vida media de 8 min, hasta 141 min de la Cloroperoxidasa (*C. fumago*) que es significativamente más estable. Debido a esta variabilidad, la búsqueda sistemática en plantas podría llevarnos a encontrar una isoenzima con mayor estabilidad que las que son utilizadas actualmente.

2.6 Mecanismo catalítico de las hemo peroxidasas.

La reacción clásica catalizada por las hemo peroxidasas es la deshidrogenación oxidativa, aunque también catalizan una gran variedad de reacciones relacionadas, incluyendo la transferencia de oxígeno, la descomposición del peróxido de hidrógeno y la halogenación peroxidativa [25].

La deshidrogenación oxidativa de una hemoperoxidasa (Fig. 6 pasos 1-3) es un proceso en el cual, como primer paso, el peróxido de hidrógeno lleva al Fe^{III} a un estado de mayor

oxidación [$\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$], estableciendo un doble enlace entre el oxígeno del peróxido de hidrógeno y el hierro del hemo para obtener un derivado oxo-ferril(Fe^{IV})porfirina con un radical libre- π catiónico asociado, llamado Compuesto I (Fig. 6 paso 1) [11;25-27].

La presencia de un agente reductor genera un segundo intermediario reducido, oxo-ferril (Fe^{IV}), llamado Compuesto II (Fig. 6 paso 2). El Compuesto II oxida una segunda molécula de sustrato regresando la enzima al estado basal [27].

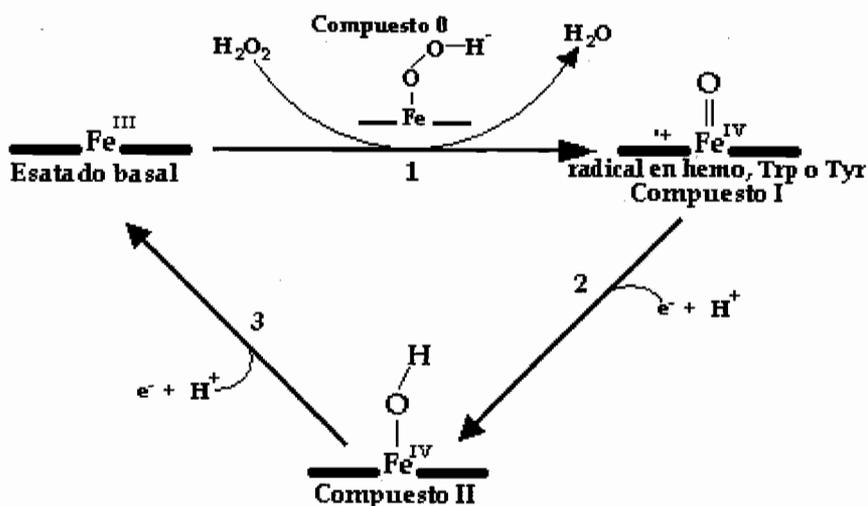


Fig. 6 Mecanismo del ciclo catalítico de las hemo peroxidasas [28].

El Compuesto I de HRP fue descubierto por Theorell, quien preparó el Compuesto I como un compuesto verde que rápidamente cambiaba a una especie roja, más tarde identificada como Compuesto II. Los Compuestos I y II fueron distinguidos por ensayos cinéticos hechos por Chance and George. A partir de estos experimentos George propuso que el Compuesto II tiene un grupo ferril Fe^{IV} , mientras que el Compuesto I tiene un hierro con un estado formal de oxidación (Fe^{V}). Posteriormente con el uso de técnicas como EPR, EXAFS y recientemente cristalografía de rayos-X se describió de una forma más adecuada el mecanismo de reacción [29].

2.6.1 Formación del Compuesto I

En el lado distal de las estructuras de muchas hemo peroxidasas se muestran un grupo de aminoácidos conservados que están de alguna forma relacionados con el mecanismo catalítico, como el par conservado His/Arg. Por el lado proximal se encuentran una histidina que pentacoordina al hemo, en la HRPC la His 170, un aspártico, Asp 247, el cual está formando un puente de hidrógeno con la His 170 y una fenilalanina, Phe 221, que estabiliza el anillo del imidazol de la His 170 mediante una interacción π - π . Además la protoporfirina está sostenida por una arginina, Arg 31, y un glutámico, Gln 76, que forman puentes salinos con los dos propionatos, y por puentes de hidrógeno con la Ser 35, Ser 73 y dos moléculas de agua (W 278, W 423). Todos estos grupos interactúan con el sitio catalítico, contribuyendo en la formación del Compuesto I (Fig. 7) [29].

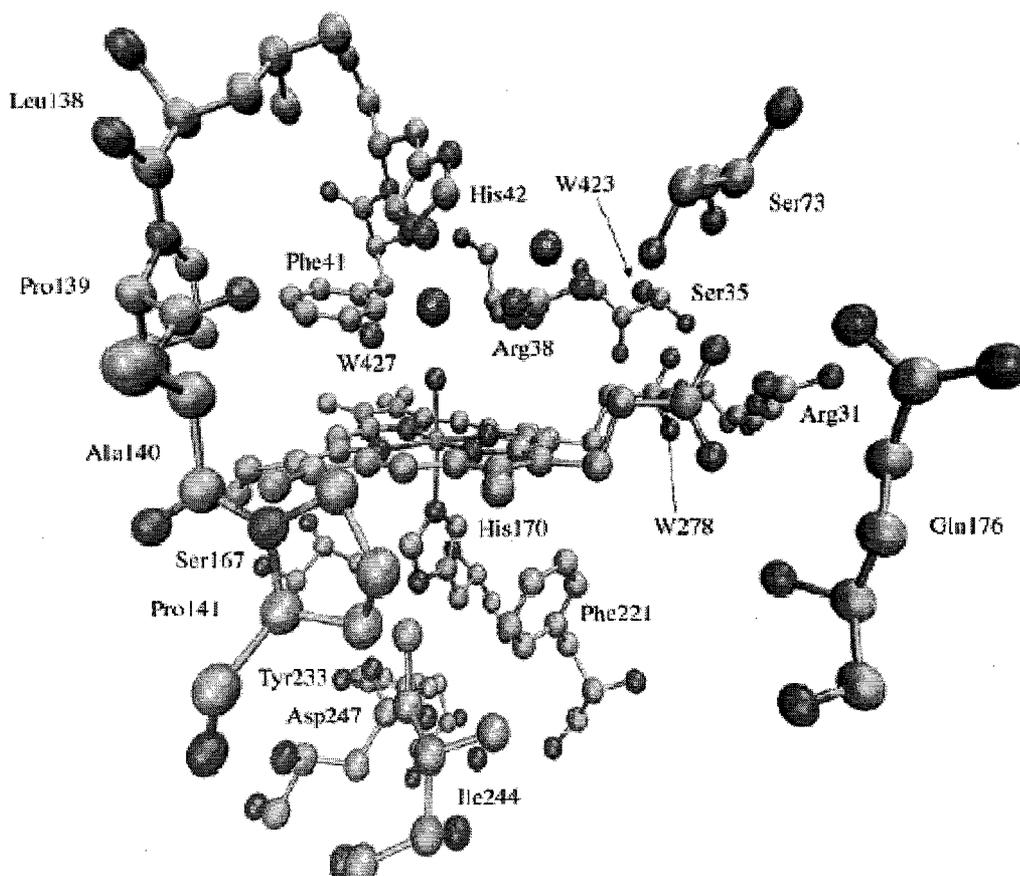


Fig. 7 Sitio activo de HRP C (PDB 1HCH) [29].

El Compuesto I de muchas hemo peroxidasas ha sido sujeto a extensas caracterizaciones físicas y químicas, evidenciando su gran similitud estructural del Compuesto I de diferentes hemo-proteínas. El Compuesto I posee dos equivalentes de oxidación por arriba del estado basal. Uno de ellos ubicado en el átomo de hierro, con un estado de oxidación ferril, mientras que el otro se localiza en el anillo de porfirina o es transferido a la cadena polipeptídica a través de alguno aminoácido cercano al hemo.

Otros estudios indican que el Compuesto I de la HRP contiene tres electrones desapareados ($S=3/2$), siendo su configuración más probable la de un hemo oxo-ferril (Fe^{VI}) con un radical π -catiónico asociado generalmente a la porfirina. Se han identificado estructuras similares para un intermediario tipo Compuesto I en las catalasas [28]. En el caso de citocromo c peroxidasas, lactoperoxidasa, el citocromo P450 mono-oxigenasa, y la prostaglandin H sintasa, el radical π -catiónico no se encuentra asociado a la porfirina, sino que se encuentra ubicado en un residuo aromático, comúnmente triptofano [30;31].

El mecanismo molecular para la formación del Compuesto I mediante la reacción de las peroxidasas con H_2O_2 fue propuesto por primera vez por Poul an Kraut [32] basandose en la estructura cristalográfica de la citocromo c peroxidasa (CcP). Ellos propusieron como primer paso la difusión del sustrato peróxido en la cavidad del hemo, desplazando a una molécula de agua que hexacoordina al hierro, formando un intermediario inestable. Este intermediario está formado por una molécula de peróxido ionizada unida covalentemente al hierro del hemo con un átomo de hidrógeno transferido a la His-distal (Fig. 8 paso B) [32;33].

En el paso siguiente la histidina realiza una catálisis ácido-base facilitando la transferencia de un protón de un oxígeno a otro (Fig. 8 paso C). Las cadenas laterales cargadas positivamente de la His y la Arg distales, ayudan a estabilizar este intermediario, promoviendo el rompimiento del enlace O-O [25;27;34;35] (Fig. 8 paso D). Por estudios de mutaciones sitio dirigidas se ha sugerido que esta Arg distal no sólo está involucrada en el rompimiento del enlace O-O del peróxido, sino que también facilita una rápida unión del peróxido al hemo. Una Asn conservada en las hemo peroxidasas (Asn 70 en HRPC, 82 en CcP, o 84 en LiP), forma un puente de hidrógeno con el $N\delta$ de la His distal, permite que la His

se encuentre en la forma de imidazolium. Se ha demostrado, con mutaciones de estos tres residuos, que la ausencia de cualquiera de ellos disminuye órdenes de magnitud o anula la actividad catalítica[33].

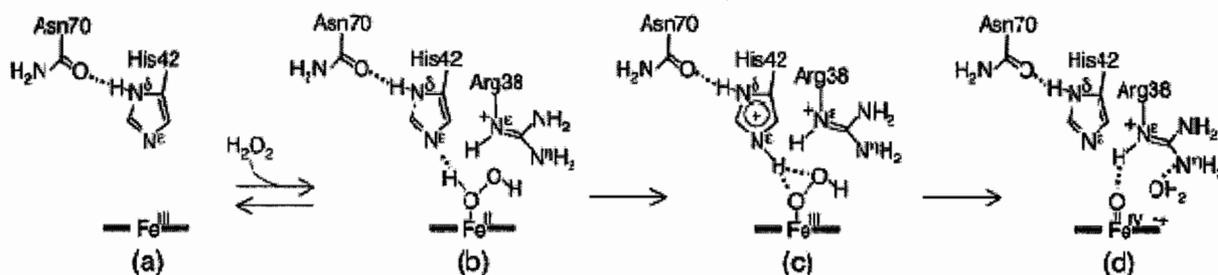


Fig. 8 Formación del Compuesto I [33].

2.6.2 Reducción de los Compuestos I y II al estado basal

La reducción del Compuesto I al Compuesto II resulta de la transferencia de un primer electrón para recuperar el radical-cationico de la proteína o de la porfirina. La reducción de un electrón del Compuesto II al estado basal involucra el regreso del estado ferril del hemo al estado férrico, así como la reducción del átomo de oxígeno a agua. El potencial oxidativo del par redox Compuesto I/Compuesto II es más alto que el del par Compuesto II/estado basal, siendo el Compuesto I una especie oxidante mucho más fuerte que el Compuesto II [31].

La oxidación de las moléculas del sustrato se acompaña de la transferencia de un protón (Fig. 9 paso 2 y 3). El puente de hidrógeno entre el NH de la Arg 38 y el oxígeno del fenol asiste la transferencia del protón del fenol a la histidina distal o al oxo-ferril conforme a la Fig. 9. Los estudios de mutagénesis sitio-dirigida indican que la Arg 38 puede interactuar recíprocamente con el sustrato reductor. El destino final del protón transferido es la His distal, en el caso de la reducción del Compuesto I [36]. Se sabe por estudios con NMR y espectroscopía Raman que en el caso de la HRP C el protón transferido no es unido al oxo-ferril del Compuesto I, ya que el oxoferril permanece con la misma configuración que en el Compuesto II.

En el caso de la reducción del Compuesto II, la arginina distal asiste de manera equivalente a la transferencia del protón con un puente del hidrógeno entre el oxígeno fenólico de una segunda molécula de sustrato. Aquí el destino final del protón es el oxígeno del ferril, con la transferencia de un electrón al hemo. En ambas transferencias de protones puede estar involucrada una molécula de agua estructural, que se encuentra equidistante de la histidina del sitio activo y la posición del oxígeno del ferril en los compuestos I y II [36].

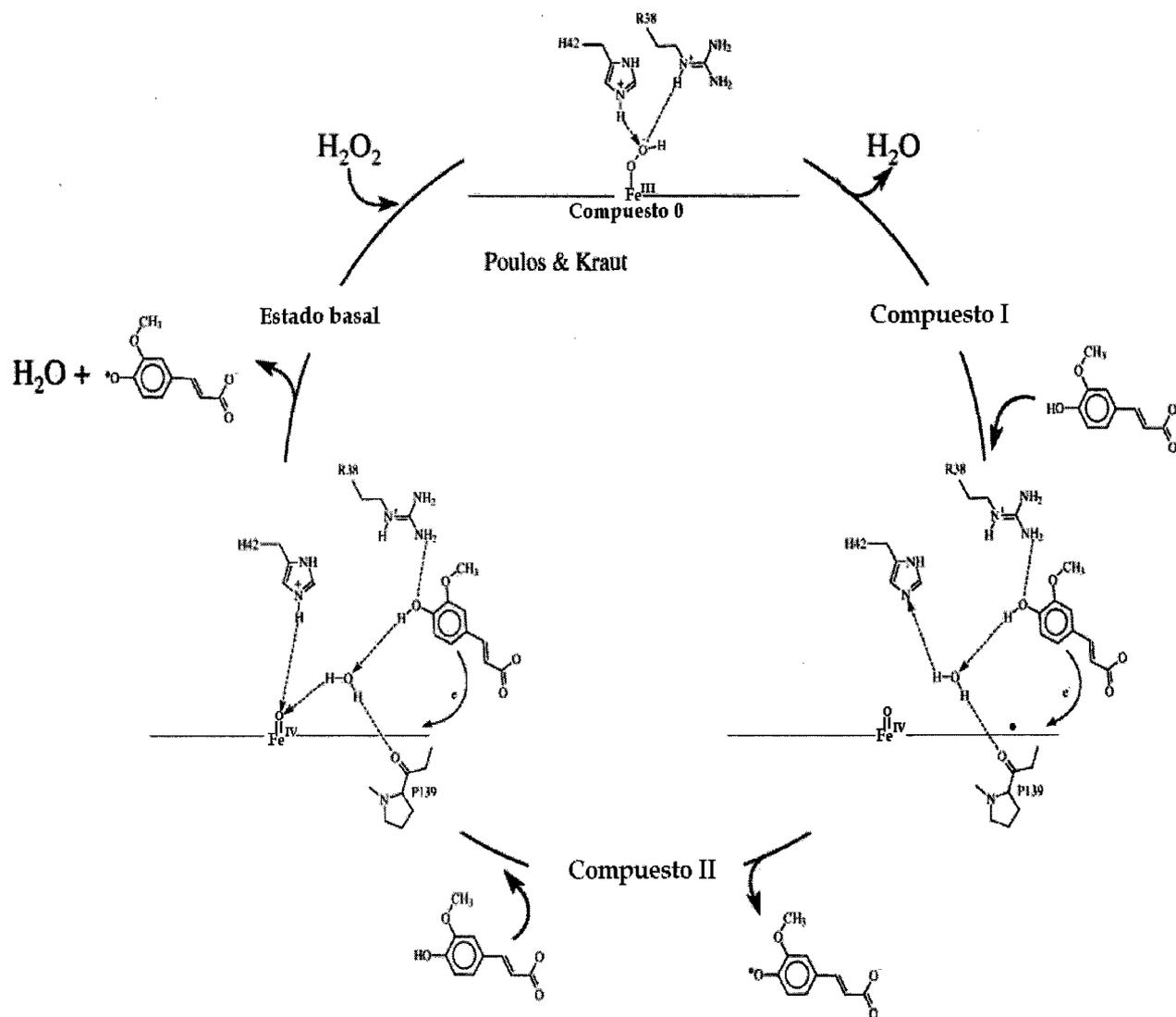


Fig. 9 Mecanismo de oxidación del sustrato [36].

2.7 Parámetros catalíticos

Michaelis y Menten establecieron en 1913 la ecuación básica que describe la etapa inicial de la reacción reversible de una enzima – un sustrato, con la siguiente formula:



Ecuación 1 Cinética una enzima-un sustrato

En la ecuación 2, la velocidad de reacción v a cualquier concentración de sustrato $[S]$ depende de k_{cat} ($V_{max}=k_{cat}[E]_0$) la cual es la velocidad máxima de formación de producto (s^{-1}) por molécula de enzima totalmente saturada con sustrato, llamado número de recambio, y de K_M , la cual es la constante de equilibrio de disociación del complejo enzima-sustrato, conocida como constante de afinidad.

$$v = \frac{k_{cat} [E]_0}{1 + \frac{K_M}{[S]}}$$

Ecuación 2 velocidad de reacción de Michaelis-Menten

La ecuación anterior es válida para cualquier reacción enzimática de un sustrato. El establecer una ecuación básica para una enzima - un producto facilitó el camino para el desarrollo de la teoría dos sustratos – dos productos de reacción, en la cual las reacciones catalizadas por peroxidasas ocupan un lugar único. Un esquema simplificado del ciclo catalítico de las peroxidasas nos permite distinguir las tres etapas irreversibles del proceso descritas por la ecuación cinética de las peroxidasas (**Ecuación 3**). Las constantes catalíticas k_1 , k_2 , k_3 son las constantes de velocidad de formación del compuesto I, de reducción del compuesto I y de reducción del compuesto II, respectivamente (

Fig. 10).

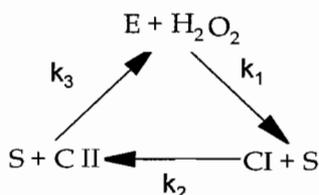


Fig. 10 Esquema básico del ciclo de las peroxidasas [11].

$$2 \frac{[E_0]}{v} = \frac{1}{k_1[H_2O_2]} + \frac{1}{[S]} \left(\frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_3} \right)$$

Ecuación 3 *Cinética de reacción del ciclo catalítico de las peroxidasas*

Britton Chance observó que la conversión espontánea del compuesto I al compuesto II se describe como una constante de reacción unimolecular (s^{-1}) [11]. La conversión espontánea es acelerada por un agente reductor. La constante de velocidad de decaimiento del compuesto I es un orden de magnitud mayor que la constante de velocidad de decaimiento del compuesto II, por lo tanto, $k_2 \gg k_3$ [11;12], y la ecuación 3 puede simplificarse a:

$$2 \frac{[E_0]}{v} = \frac{1}{k_1[H_2O_2]} + \frac{1}{k_3[S]}$$

Ecuación 4 *Cinética de reacción del ciclo catalítico de las peroxidasas considerando que $k_2 \gg k_3$*

2.8 *Mecanismo de inactivación*

En ausencia de sustrato reductor, o cuando se exponen a una alta concentración de peróxido de hidrógeno, las hemo peroxidasas muestran una inactivación en la cual el peróxido convierte el Compuesto II en un compuesto muy reactivo, llamado Compuesto III, que es el radical libre peroxi-ferril(III)porfirina (Fig. 11 paso 1). El Compuesto III puede seguir tres vías de oxidación (Fig. 11 paso 2, 3 y 4). En la primera vía, la inactivación se debe al potencial de esta especie reactiva para oxidar el anillo de porfirina (Fig. 11 paso 2). En la segunda vía, el Compuesto III regresa al estado basal después de la oxidación de un aminoácido de la misma proteína (Fig. 11 paso 3). La tercera vía es la liberación espontánea de un radical hidroperoxilo, por el decaimiento unimolecular del Compuesto III [25;37].

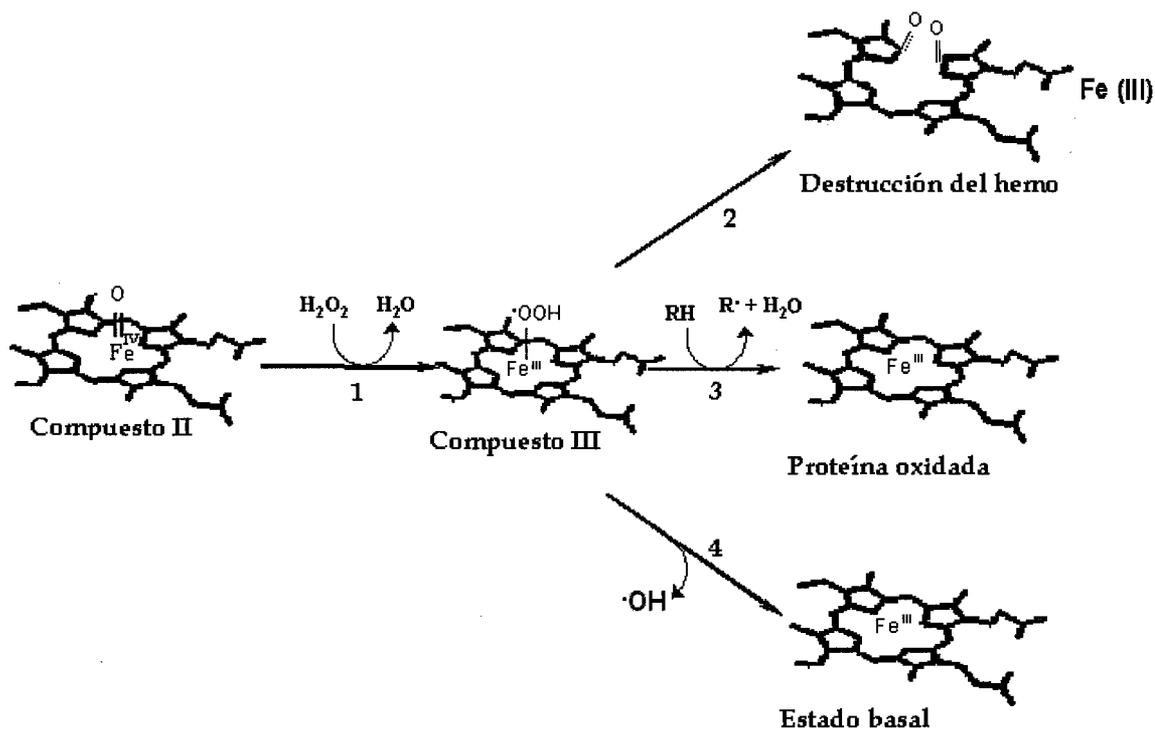


Fig. 11 Mecanismo propuesto de inactivación por H₂O₂ [25].

Hasta este momento las hemo peroxidasas conocidas habían mostrado una alta sensibilidad a la inactivación con el peróxido de hidrógeno, lo que ha sido una limitante importante para sus potenciales aplicaciones biotecnológicas. A lo largo de la historia se han hecho diversos estudios de este fenómeno, se ha aplicado la ingeniería de proteínas buscando una mayor estabilidad, así como la purificación de nuevas hemo peroxidasas, de diferentes fuentes con esta característica. A pesar de todos estos esfuerzos no se había logrado el diseño o purificación de una enzima con una estabilidad ante el peróxido de hidrógeno suficientemente alta para poder desarrollar todo su potencial.

En un proyecto previo se realizó una búsqueda sistemática de alguna hemoperoxidasa estable a la inactivación con el peróxido de hidrógeno. Entre la gran variedad de isoformas presentes en la raíz de rábano japonés (*Raphanus sativus*) encontramos una isoforma muy estable al peróxido de hidrógeno, que denominamos Zo peroxidasa (ZoPrx), por la palabra griega Zo que significa permanente.

La identificación de esta proteína es esencial, ya que es el primer paso para otros estudios que suponen en última instancia una caracterización que relacione la estructura y función. Las proteínas en general pueden ser identificadas por diversos procedimientos, entre los que se incluyen la secuenciación del extremo N-terminal, detección con anticuerpos específicos, composición de aminoácidos, co-migración con proteínas conocidas, y por supuesto la secuenciación directa de aminoácidos por medio de espectrometría de masas.

2.9 *Espectrometría de masas*

Debido a su rapidez y elevada sensibilidad, la espectrometría de masas se ha convertido en el método de elección para la identificación de proteínas que es el primer paso para el estudio del proteoma de distintos organismos. También permite la caracterización de modificaciones postraduccionales que presentan relevancia fisiológica, tales como la glicosilación y la fosforilación.

La espectrometría de masas es una tecnología que permite producir iones en fase gaseosa a partir de moléculas orgánicas o inorgánicas, clasificarlos en función de su relación masa-carga (m/z) y medir su intensidad.

Los espectrómetros de masa están formados al menos por una fuente de iones, un analizador de masas y un detector que mide la relación masa/carga (m/z). Las muestras a analizar son introducidas en la fuente de iones donde los componentes de la muestra son convertidos en iones en fase gaseosa. Estos iones son transferidos al analizador donde son acelerados y separados según su relación m/z utilizando diferentes principios físicos según el tipo de analizador.

Mediante esta técnica puede determinarse el peso molecular y la abundancia de los componentes de una mezcla. Los iones analizados pueden corresponder a moléculas enteras, aductos o fragmentos de moléculas. El análisis de fragmentos iónicos formados a partir de una determinada molécula provee, además, de información sobre la estructura química de ésta.

3. Hipótesis

La estabilidad oxidativa de la ZoPrx es una característica intrínseca, dependiente del mecanismo de reacción y de las propiedades cinéticas del Compuesto III.

4. Objetivo

Realizar un análisis detallado de las características catalíticas de la ZoPrx, haciendo una comparación con las otras hemo peroxidases lábiles.

4.1 *Objetivos particulares*

- Obtener la secuencia de aminoácidos de la proteína mediante espectrometría de masas.
- Describir el mecanismo catalítico de la ZoPrx, haciendo una comparación con el mecanismo de las peroxidases lábiles.
- Proponer un modelo que describa la tolerancia al peróxido de la ZoPrx.

5. Métodos

5.1 Purificación

Los rábanos japoneses frescos se compraron en un mercado local y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización. El jugo de rábano se obtuvo usando un extractor comercial. El extracto crudo fue equilibrado en amortiguador de fosfato 10 mM, pH 6.1 y centrifugado a 14,000 g por 20 min a 4 °C. El sobrenadante se filtró y concentró por ultrafiltración usando una celda Amicón con una membrana con corte de 10 kDa.

Como primer paso se utilizó una columna de intercambio catiónico, Macro-Prep High-S (Bio-rad), equilibrada con amortiguador de fosfato 10 mM, pH 6.1. La columna se cargó con el extracto y lavada con el amortiguador de equilibrio usando un flujo de 2 ml/min. La proteína retenida se eluyó con un gradiente lineal de 0 – 1 mM NaCl en el mismo amortiguador.

La fracción seleccionada según su estabilidad al peróxido de hidrógeno, obtenida durante la cromatografía de intercambio catiónico, se cargó en una columna de intercambio aniónico, Macro-Prep High-Q (Bio-rad), previamente equilibrada con amortiguador de fosfato 10 mM, pH 6.1. La columna se lavó en el mismo amortiguador de equilibrio usando un flujo de 2 mL / min. La proteína retenida se eluyó con un gradiente lineal de 0 – 1 M de NaCl.

La fracción seleccionada durante la cromatografía de intercambio aniónico se concentró y dializó, usando una celda Amicón con una membrana con corte 10 kDa y amortiguador de acetatos 10 mM pH 4. La solución equilibrada se cargó en una columna de intercambio aniónico débil, Macro-Prep CM (Bio-rad), lavando y equilibrando en el mismo amortiguador. La proteína retenida se eluyó con un gradiente lineal 0 -1 M de NaCl en el mismo amortiguador.

La fracción recolectada se dializó en amortiguador de fosfato 10 mM, pH 6.1. Posteriormente se equilibró con 1.8 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a temperatura ambiente. La fracción recolectada se cargó en una columna de interacción hidrofóbica, Macro-Prep t-Butyl HIC (Bio-rad), equilibrada con 1.8 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en amortiguador de fosfato 10 mM, pH 6.1. Se eluyó con un gradiente lineal descendiente de la misma sal de 1.8 – 0 M. La fracción seleccionada se dializó en amortiguador de fosfato 10 mM, pH 6.1 y concentró por ultrafiltración.

En el seguimiento de la actividad de peroxidasa durante la purificación, se utilizó 16 mM de guayacol ($\epsilon_{470} = 26.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) como sustrato y 1 mM de H_2O_2 en 1 mL de amortiguador de fosfato 60 mM, pH 6.1. Para seleccionar las fracciones que presentaban la mayor estabilidad al H_2O_2 , se realizaron pruebas de estabilidad incubando con 10 mM de H_2O_2 y detectando la actividad residual usando guayacol 16 mM como sustrato reductor en amortiguador de fosfato 60 mM, pH 6.1.

La concentración final de proteína de las diferentes fracciones se determinó con el método de Bradford utilizando el reactivo de Bio-rad. La reacción se preparó con 200 μL del reactivo de Bio-rad y la cantidad necesaria de cada fracción en agua, con un volumen final de 1 mL, se dejó reaccionar por 5 min y se midió la absorbancia a 595 nm. El valor obtenido se comparó con una curva estandarizada con BSA.

Para determinar la identidad y la pureza de la fracción purificada, se realizó electroforesis en condiciones desnaturalizantes y nativa estimada por actividad y con azul de coomassie. Para la electroforesis en condiciones nativas se utilizó un gel de poliacrilamida al 8 %, preparado con SDS al 0.1%. El gel se corrió a 19 mA y 250 V por un tiempo de 105 min. La muestra fue preparada con solución lítica (Tris-Cl 0.125 M, pH 8; SDS 0.01%; glicerol 20%) sin hervir. El gel fue revelado por actividad utilizando como sustrato 3,3',5,5' Tetrametilbencidina (TMB) en una solución comercial estabilizada con peróxido de hidrógeno (Sigma) y para proteína usando azul de coomassie.

En la electroforesis en condiciones desnaturalizantes se utilizó un gel de poliacrilamida al 10%, utilizando como referencia un marcador de peso molecular comercial (Invitrogen), utilizando como revelador azul de coomassie.

5.2 Determinación del peso molecular por cromatografía de exclusión molecular.

La determinación del peso molecular de la ZoPrx en su forma nativa se realizó mediante una cromatografía de exclusión molecular, utilizando una columna Hiloal 26/60 Superdex 200 de 60 cm de altura por 2.6 cm de ancho (Pharmacia). Como estándares de calibración se utilizaron Tiroglobulina de 670 kDa, alcohol deshidrogenasa 150 kDa, albúmina 66 kDa, anhidrasa carbónica 29 kDa y lactoalbúmina 14.4 kDa. La cromatografía se realizó en amortiguador de fosfato 100 mM, pH 6.1 con un flujo de 2.5 ml/min.

5.3 Digestión del gel SDS-PAGE con tripsina y espectrometría de masas.

Para la caracterización por espectrometría de masas, las bandas de proteína observadas en el gel SDS-PAGE al 10 % fueron cortadas y desteñidas con 500 µl de una solución de metanol al 50 % y ácido acético al 5 % durante, 12 horas a temperatura ambiente. Posteriormente la solución para desteñir fue removida y los geles se lavaron con 200 µl de una solución de NH_4HCO_3 25 mM y se deshidrataron con 200 µl de acetonitrilo (ACN) durante 5 minutos, el ACN residual fue evaporado al vacío en SpeedVac por 2 ó 3 min. Los puentes disulfuro de las proteínas en el gel se redujeron con 50 µl de DTT 10 mM en la solución de NH_4HCO_3 e incubando durante 1 hora a 25 °C. Posteriormente, las cisteínas reducidas se carbamidometilaron con 50 µl de iodoacetamida 50 mM en amortiguador de NH_4HCO_3 e incubando durante 30 minutos a 25 °C en oscuridad. Los geles se lavaron con la solución de NH_4HCO_3 y deshidrataron con ACN tres veces durante 5 min. Posteriormente, se añadieron 15 µl de tripsina (20

ng/ μ l en amortiguador de NH_4HCO_3 50 mM pH 8.5) y se incubó durante 45 minutos a 4 °C. La tripsina no absorbida se eliminó y el gel se cubrió con el volumen necesario de la solución de NH_4HCO_3 , dejando la digestión incubando durante 12 horas a 37 °C. Posteriormente se realizaron tres extracciones incubando el gel por 10 minutos en una solución de ácido fórmico 5 % y ACN 50 %. La muestra se evaporó al vacío en el SpeedVac hasta un volumen de 15 μ l y se desaló con una microcolumna C_{18} de fase reversa, eluyendo con 5 μ l ACN.

La muestra digerida con tripsina fue analizada en un Espectrómetro de masas con electrospray LCQ (Thermo-Finnigan) acoplado a un equipo HPLC de nanoflujo Surveyor (Thermo Electron). La mezcla de péptidos digeridos fue separada por medio del HPLC empleando una columna capilar C_{18} eluyendo con un gradiente 0 a 100 % de ACN con un flujo de 50 nl/min. El efluente se hizo pasar por una fuente de ionización con nanospray, aplicando un voltaje de 0.8 kV y la temperatura del capilar se ajustó a 110 °C. El analito altamente cargado pasó a un analizador LC/MS con trampa de iones tridimensional. Se obtuvieron una serie de espectros consecutivos de barrido y de fragmentación MS/MS, producto de las señales más abundantes seleccionadas manualmente. Como gas de colisión se utilizó helio, ajustando la energía de colisión relativa para cada uno de los iones fragmentados en el rango de 20 a 47 % dependiendo del estado de carga del ión precursor.

En el análisis de los espectros obtenidos por LC-MS/MS se utilizó el programa SEQUEST para la identificación de las proteínas a partir de los espectros MS/MS contenidos en la base de datos, confirmando todos los péptidos identificados de forma manual para evitar falsos positivos. En el caso de no lograr la identificación de los péptidos mediante la búsqueda en bases de datos, el análisis fue hecho manualmente de los espectros MS/MS obtenidos. Con los péptidos caracterizados se realizó una búsqueda preliminar de secuencias similares usando el programa BLAST (Basic Local Alignment Tools, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>).

5.4 Estabilidad de ZoPrx ante el H₂O₂

La estabilidad de la peroxidasa ante el H₂O₂ se evaluó por cuatro diferentes métodos comparándola con la de la peroxidasa HRP A2 (p-6140 de Sigma);

1) Mediante el seguimiento de la cinética de inactivación, con una mezcla de reacción con ZoPrx 2 nM o HRP A2 13 nM incubando en presencia de peróxido de hidrógeno (0, 1 ó 10 mM) en amortiguador de fosfato 60 mM, pH 6.1 (volumen total 1 mL). A tiempos determinados se tomaron alícuotas de 5 µl y su actividad residual fue estimada midiendo la velocidad inicial de oxidación de guayacol 20 mM y H₂O₂ 10 mM en amortiguador de fosfato 60 mM, pH 6.1 (volumen total 1 mL).

2) Con la incubación por 12 h de ZoPrx 20 nM o HRP A2 50 nM en presencia de diferentes relaciones molares de H₂O₂:E (0 a 100,000) en amortiguador de fosfato 60 mM, pH 6.1. Después del tiempo indicado se tomaron alícuotas de 100 µL de cada relación molar determinando su actividad residual empleando guayacol 16 mM y H₂O₂ en 1 ml del mismo amortiguador.

3) Mediante el número total de recambio calculado con el número total de moléculas de sustrato oxidadas por cada molécula de enzima durante toda la vida útil de la ZoPrx y la HRP A2 bajo condiciones de operación usando 0.014 pM de cada enzima en amortiguador de fosfato 60 mM, pH 6.1, en presencia de H₂O₂ (1 ó 10 mM) y de ABTS 3 mM.

4) Siguiendo el espectro de la integridad de la banda Soret durante la incubación con 1 ó 10 mM de H₂O₂ y con una concentración de la enzima de 1.5 nM en amortiguador de fosfato a pH 6.1 en un volumen total de 100 µL.

5.5 Producción de Oxígeno

El oxígeno producido por la actividad de catalasa se determinó con un electrodo polarográfico de 220 mm, acoplado a un amplificador de oxígeno disuelto (Ingold). El sistema de reacción se equilibró con un flujo de nitrógeno para remover el oxígeno en el

medio. Con una mezcla de reacción con ZoPrx o HRPA2 0.1 μM en amortiguador de fosfato 60 mM, pH 6.1 (volumen total 2 ml), iniciando la reacción con 10 mM de H_2O_2 .

5.6 Perfil de estabilidad a diferentes pHs

La estabilidad de ZoPrx o HRPA2 a diferentes pHs se valoró con la incubación de 20 y 50 nM de la enzima respectivamente utilizando diferentes sistemas amortiguadores en un intervalo de pH entre 4.5 y 8.0. A tiempos determinados se tomaron alícuotas de 5 μl y su actividad residual fue determinada estimando la velocidad inicial de oxidación de guayacol 20 mM y H_2O_2 10 mM en el amortiguador correspondiente a cada pH (volumen total 1mL). El cálculo de la vida media se realizó utilizando el programa Enz-Fitter de Biosoft (Ferguson MO). Los amortiguadores utilizados fueron: citratos 50 mM, pH 4.5 y 5.5, fosfato 50 mM, pH 6.1 y 7.0 y boratos 50 mM, pH 8.0.

5.7 Parámetros catalíticos

Los parámetros catalíticos K_M y k_{cat} aparentes de ZoPrx o HRPA2 se determinaron para los sustratos guayacol ($\epsilon_{470} = 26.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), TMB ($\epsilon_{655\text{nm}} = 39,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y H_2O_2 . Estos parámetros fueron determinados mediante las velocidades de reacción iniciales con diferentes concentraciones de uno de los sustratos, conservando el segundo sustrato a una concentración de saturación fija y viceversa. El ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten se realizó mediante el programa Enz-Fitter de Biosoft (Ferguson MO).

Los parámetro catalíticos de las peroxidasas se evaluaron con la ecuación que describe la cinética del ciclo catalítico básico de las peroxidasas (**Ecuación 4**).

La velocidad inicial de oxidación de los diferentes sustratos se realizó variando las concentraciones de peróxido de hidrógeno (0.25 – 1.5 mM), ABTS (0.5 – 1.5 mM), guayacol (2 – 8 mM) en presencia de ZoPrx 1.4 nM. Para la peroxidasa de referencia

HRPA2 se variaron las concentraciones de H_2O_2 (0.4 – 0.6 mM), ABTS (0.2 -0.6 mM), guayacol (2 – 8 mM) en presencia de HRPA2 10 μM .

5.8 *Identificación de especies catalíticas.*

La identificación de las especies catalíticas de las peroxidasas, se llevó acabo mediante el seguimiento del espectro (Uv-Vis) de la reacción de 20 nM de ZoPrx ó 50 nM HRPA2 en presencia de 1eq de H_2O_2 para formar el Compuesto I. La formación del Compuesto II, el regreso de la enzima al estado basal fueron observados con 2 adiciones sucesivas de 1 eq de p-cresol, como sustrato reductor, para completar el ciclo catalítico.

6. Resultados

6.1 Purificación e identificación

En un trabajo previo se realizó la búsqueda sistemática en diferentes plantas de alguna hemo peroxidasa con estabilidad al peróxido de hidrógeno, identificando una isoenzima con extraordinaria estabilidad, purificada a partir la raíz del rábano japonés *Raphanus sativus*.

La primera fase de este trabajo fue ajustar el procedimiento de purificación utilizado previamente para obtener mayor cantidad de enzima pura. Se extrajo el jugo de aproximadamente 5 kg de rábano japonés utilizando un extractor comercial, generando alrededor de 5 l de extracto crudo con un contenido protéico de 1,556 mg y una actividad específica de 110 U mg⁻¹ utilizando guayacol como sustrato reductor. Mediante tres pasos de cromatografía de intercambio iónico, uno de interacción hidrofóbica y un refinado por permeación en gel, al final se obtuvo una preparación de pura de 1.7 mg de proteína con una actividad específica de 1,787 U mg⁻¹. Esta preparación mostró una estabilidad de más del 70 % de su actividad residual en presencia de 10 mM H₂O₂ (Tabla 2) Esta enzima fue denominada **Zo** peroxidasa por la palabra griega Zo que significa "permanente". En investigaciones anteriores de otros autores sobre las hemo peroxidasas de *Raphanus sativus* no se encontró ninguna isoforma con las características de peso molecular, punto isoeléctrico y estabilidad que presenta la ZoPrx[38;39]. Esto es posiblemente debido a que esta isoforma se encuentra representada únicamente por el 1.8 % de la actividad total de peroxidasa en el extracto de rábano, y por lo tanto no puede ser identificada sino hasta separarla de las isoformas mayoritarias, todas ellas lábiles al peróxido de hidrógeno.

Tabla 2 Resumen de purificación de la ZoPrx.

Fracción	Proteína total (mg)	Actividad (U)	Actividad específica (U/ μ g)	Veces de purificación	Rendimiento por actividad (%)	Tiempo de vida media (min)
Extracto crudo	1,556	172,150	110	1	100	55
Intercambio Catiónico (High-S) pH 6.1	936	70,989	75	0.68	41	20
Intercambio aniónico (High-Q) pH 6.1	825	17,406	21	0.19	10	60
Intercambio catiónico (CM Cellulose) pH 6.1	16	10,921	682	6.1	6.3	120
Interacción hidrofóbica (t-butyl sepharosa) pH 6.1	1.7	3,128	1,787	16.1	1.8	Estable

* (U) Cantidad de enzima requerida para generar 1 μ mol de producto por minuto.

** El tiempo de vida media fue calculado después de la incubación con 1 mM de H₂O₂ en relación con la actividad inicial.

Una forma de identificar una hemo peroxidasa más allá de su actividad de peroxidasa es mediante la señal en el espectro de una banda de absorbancia con un máximo alrededor de 400 nm, llamada banda Soret, muy característica de las hemo proteínas. La ZoPrx presenta la coloración roja característica de las hemo proteínas con una banda de absorbancia con un máximo a 403 nm y un Rz de 3.2 que es la relación entre la intensidad de la banda Soret y el fondo proteico a 280 nm (Fig. 12). El valor de Rz es intrínseco para cada hemo proteína y sirve como indicador para evaluar la pureza de las preparaciones, la HRP pura presenta un Rz de alrededor de 3.

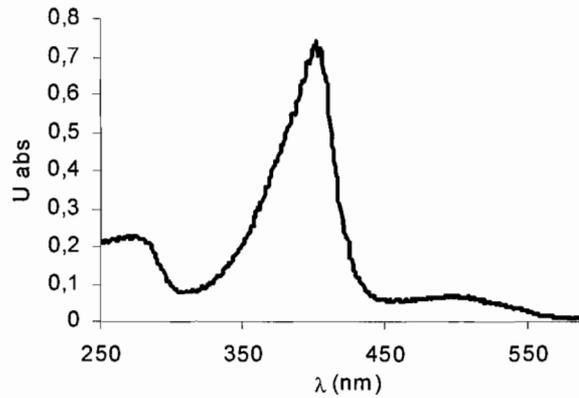


Fig. 12 Banda Soret de ZoPrx

El punto isoeléctrico de la ZoPrx fue determinado experimentalmente mediante isoelectroenfoque, con un pI de 4. A pesar del bajo punto isoeléctrico de la ZoPrx, de forma atípica no interaccionó con las cargas de las matrices de intercambio aniónico, en ninguna de las condiciones en la que fue purificada. Esto podría deberse a algún factor como glicosilaciones que estén impidiendo la interacción de las cargas de la proteína con la matriz.



Fig. 13 Gel de isoelectroenfoque. Carril 1 ZoPrx, carril 2 marcados de pI.

La ZoPrx se muestra como una proteína homogénea, tanto en permeación en gel como en una electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, ya sea revelada por actividad o por proteína, indicando ser un monómero con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa. Sin embargo, al someter la preparación a una electroforesis en condiciones desnaturalizantes observamos la presencia de una doble banda (Fig. 14). Con la finalidad de determinar la posible identidad de las proteínas ZoPrx1 y ZoPrx2 (de menor y mayor migración respectivamente) se realizó la caracterización mediante espectrometría de masas.

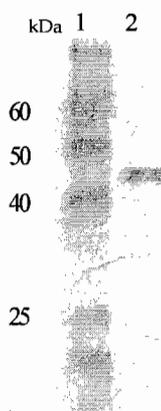


Fig. 14 SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. Carril 1, Marcador de peso molecular. Carril 2, ZoPrx.

6.2 Espectrometría de masas y análisis de los péptidos identificados

La determinación de la estructura primaria de una proteína es el primer paso para la caracterización estructural. Complementando con otros estudios bioquímicos, se puede obtener finalmente un análisis de la relación estructura función de las proteínas. Debido a su rapidez y elevada sensibilidad, la espectrometría de masas se ha convertido en el método más utilizado para la caracterización de proteínas.

Para la secuenciación de los péptidos se obtuvieron tres tipos de espectros: de barrido completo, de alta resolución (ZoomScan) y de fragmentación o espectro MS/MS. En general, los espectros de barrido mostraban señales que correspondían a diferentes

estados de carga de los péptidos presentes en la muestra. Los espectros de alta resolución se utilizaron para determinar la carga del ión correspondiente y el peso molecular del péptido.

En los espectros de barrido de la ZoPrx se identificaron varios péptidos, generalmente de una o dos cargas, siendo los primeros los más frecuentes. Para la ZoPrx1 se identificaron péptidos con masa de: 588.4, 616.5, 729.5, 733.5, 801.6, 807.4, 824.4, 853.5, 901.5, 995.6, 1005.6, 1065.5, 1376.6, 1433.5, 2247.8, 2273.4, 2419.4, 2401.2 Da y un glicopéptido de carga triple de 5157 Da. En análisis de ZoPrx2 se identificaron los siguientes péptidos: 616.3, 729, 809.3, 922.5, 1005.6, 1061.5, 1287.5, 2247.8. Sin embargo, sólo se logró en cuatro de estos péptidos en la ZoPrx1 y tres en la ZoPrx2, obtener información suficiente de los espectros de fragmentación MS/MS para poder deducir su secuencia de aminoácidos.

Como resultado del análisis de los espectros de masas obtenidos de la ZoPrx1 y de la ZoPrx2, se obtuvieron las siguientes secuencias de aminoácidos: 729.5 Da - IGASI/LI/LR, 1005.6 Da - GFNVVDNI/LK, 2247.8 Da - FSAVGI/LNTNDI/LVAI/LSGAHTFGR, identificadas en ambas isoenzimas, así como el péptido de 853.5 Da - CAVFSNR y el glicopéptido de 5157 Da con la serie de azúcares DeoxyHex-Deoxyhex-Hex-Hex---, sólo se identificaron en la ZoPrx1 (Fig. 15 a Fig. 19).

Las dificultades encontradas en la caracterización de las secuencias no están relacionadas únicamente con la intensidad de las señales o los límites de detección de la técnica. Así, es frecuente encontrar péptidos que generan espectros de fragmentación dominados por una o unas pocas señales mayoritarias que son insuficientes para determinar la secuencia del péptido. Este comportamiento deriva de las características químicas de las secuencias peptídicas. Este es el caso, por ejemplo, de péptidos con modificaciones químicas o post-traduccionales que impliquen la formación de enlaces covalentes de baja energía (por ejemplo, fosforilación o glicosilación) o que provean de una estabilidad especial al fragmento contra ruptura. A pesar de esto, la fragmentación en estos enlaces puede estar tan favorecida que produzca espectros MS/MS dominados por uno o unos pocos iones sin que aparezca otra información de utilidad para la

secuenciación. Las limitaciones que encontramos para la secuenciación directa de la ZoPrx puede deberse a la presencia de una o varias de estas características químicas en su estructura.

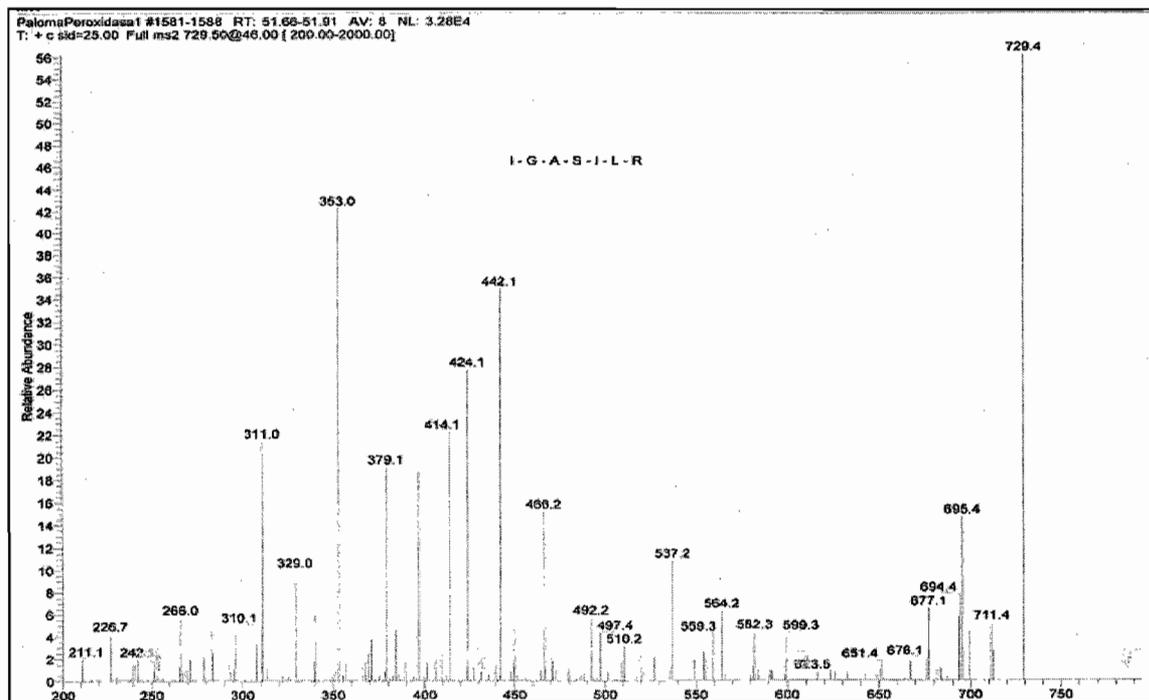


Fig. 15 Espectro del péptido 729.5 D - I/LGASI/LI/LR

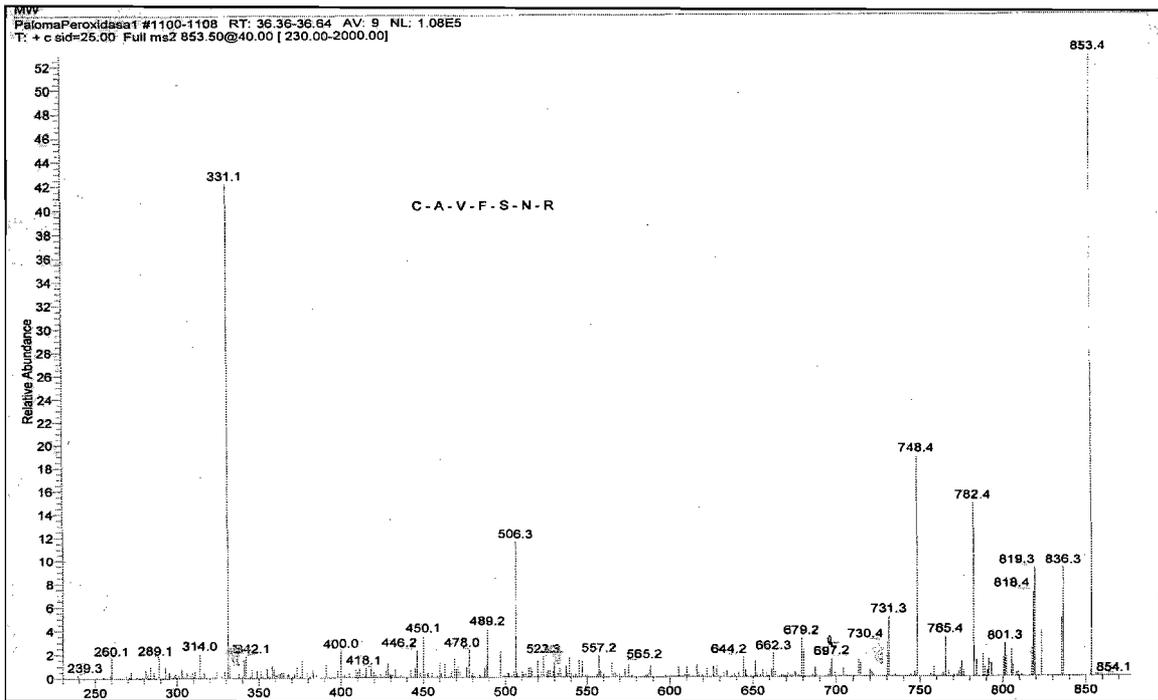


Fig. 16 Espectro del péptido 853.5 Da - CAVFSNR

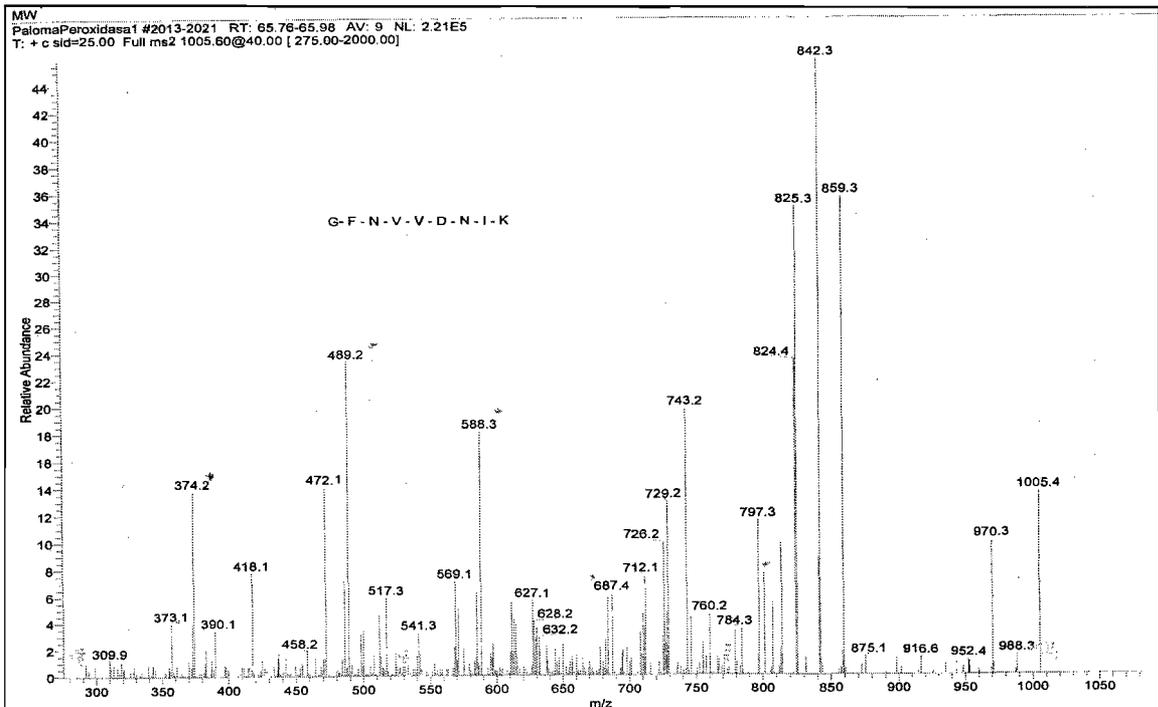


Fig. 17 Espectro del péptido 1005.6 Da - GFNVVDNI/LK

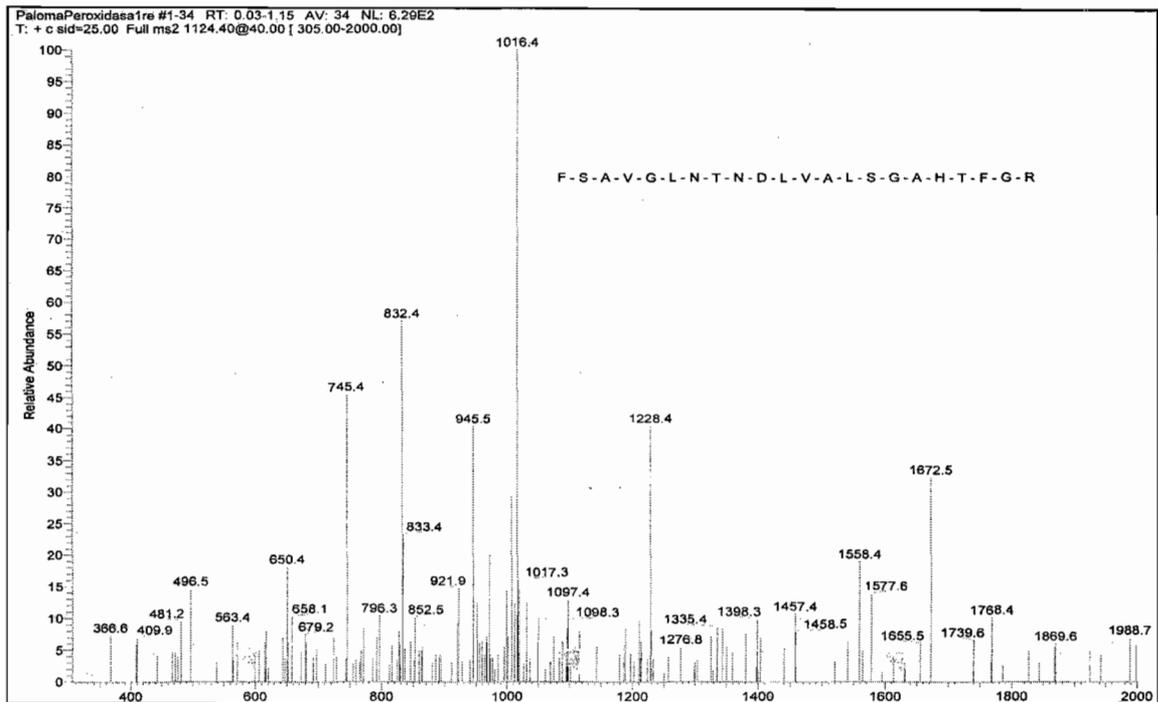


Fig. 18 Espectro del péptido 2247.8 Da -FSAVGI/LNTNDI/LVAI/LSGAHTFGR

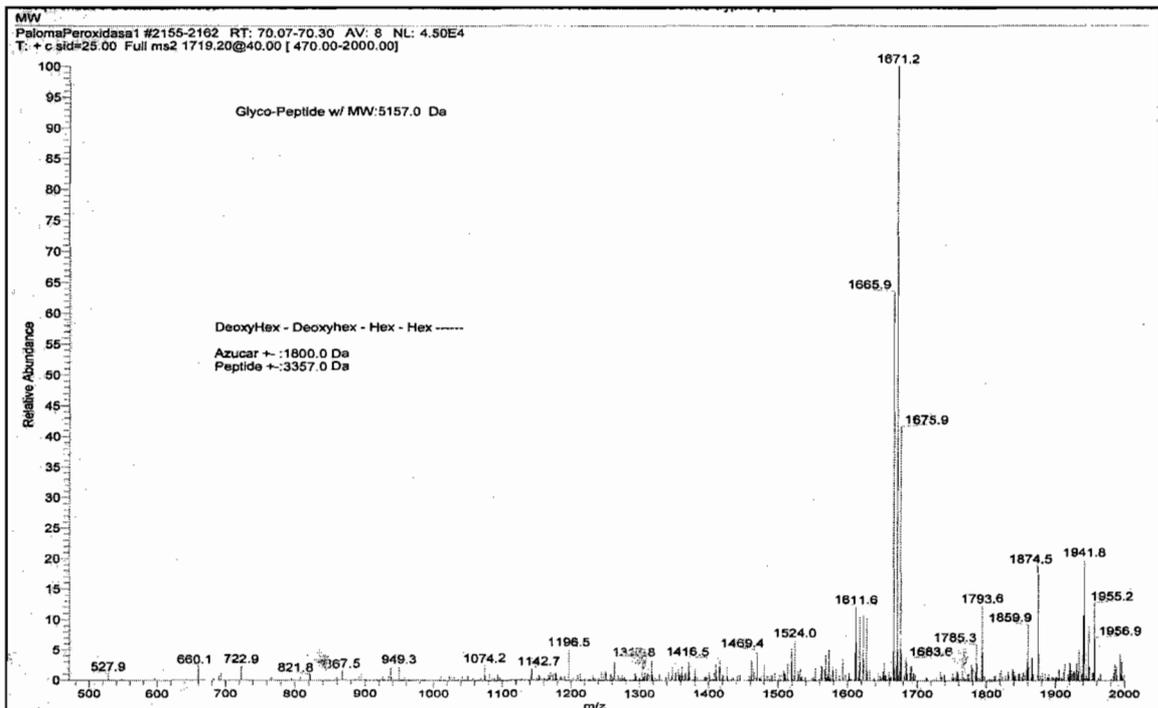


Fig. 19 Espectro del glicopéptido con la serie de azúcares DeoxyHex-Deoxyhex-Hex-Hex---

Ya que las propiedades fisicoquímicas de ambas isoformas de ZoPrx son muy parecidas: punto isoeléctrico, peso molecular y estabilidad al peróxido, junto con la información obtenida mediante la espectrometría de masas, podemos decir que es muy probable que la diferencia entre ellas se debe a variaciones post-traduccionales, p. ej., a diferencias en el patrón de glicosilación de la misma proteína.

6.3 Asignación de homólogos de ZoPrx

Con la secuencia de los péptidos obtenidos experimentalmente realizamos una búsqueda de posibles homólogos en la base de datos especializada en peroxidases PEROXIBASE del Swiss Institute of Bioinformatics. De las 3063 secuencias depositadas al momento del estudio, encontramos la similitud más significativa con las secuencias de las isoformas aniónicas ATPrx53 de *A. thaliana* y HRP2 de *A. rusticana*, seguidas por la peroxidasa 72 de *Populus trichocarpa* (PtPrx72) y la secuencias parciales de *Populus euphratica* (PtPrx72) y *Prunus persica* (PpePRX01) (Fig. 20). Al alinear los fragmentos experimentales de estas peroxidases se pudo asignar el aminoácido que corresponde en la ambigüedad experimental de I/L. También se identificaron algunos aminoácidos que forman parte del sitio catalítico:

- Arg 38, ubicada en la parte distal del grupo hemo. Residuo fundamental para la catálisis, participando en la formación del Compuesto I [40].
- His 170, que coordina al grupo hemo del lado proximal [16].
- Phe 180, que participa en la unión del sustrato reductor [41].
- Cys 177, que es una de las ocho cisteínas invariantes en las hemo peroxidases de la clase III, que participa en la formación de un enlace disulfuro junto con la Cys 209 [42].
- Parte de la secuencia de aminoácidos que pertenece a la región variable que comprende a la hélice F' [18].

Dado que no se observan diferencias significativas entre las secuencias de los sitios activos de la peroxidasa estable ZoPrx y las peroxidosas lábiles HRP A2 y ATPr53, es posible que la estabilidad no esté determinada únicamente por los aminoácidos que forman el sitio activo.

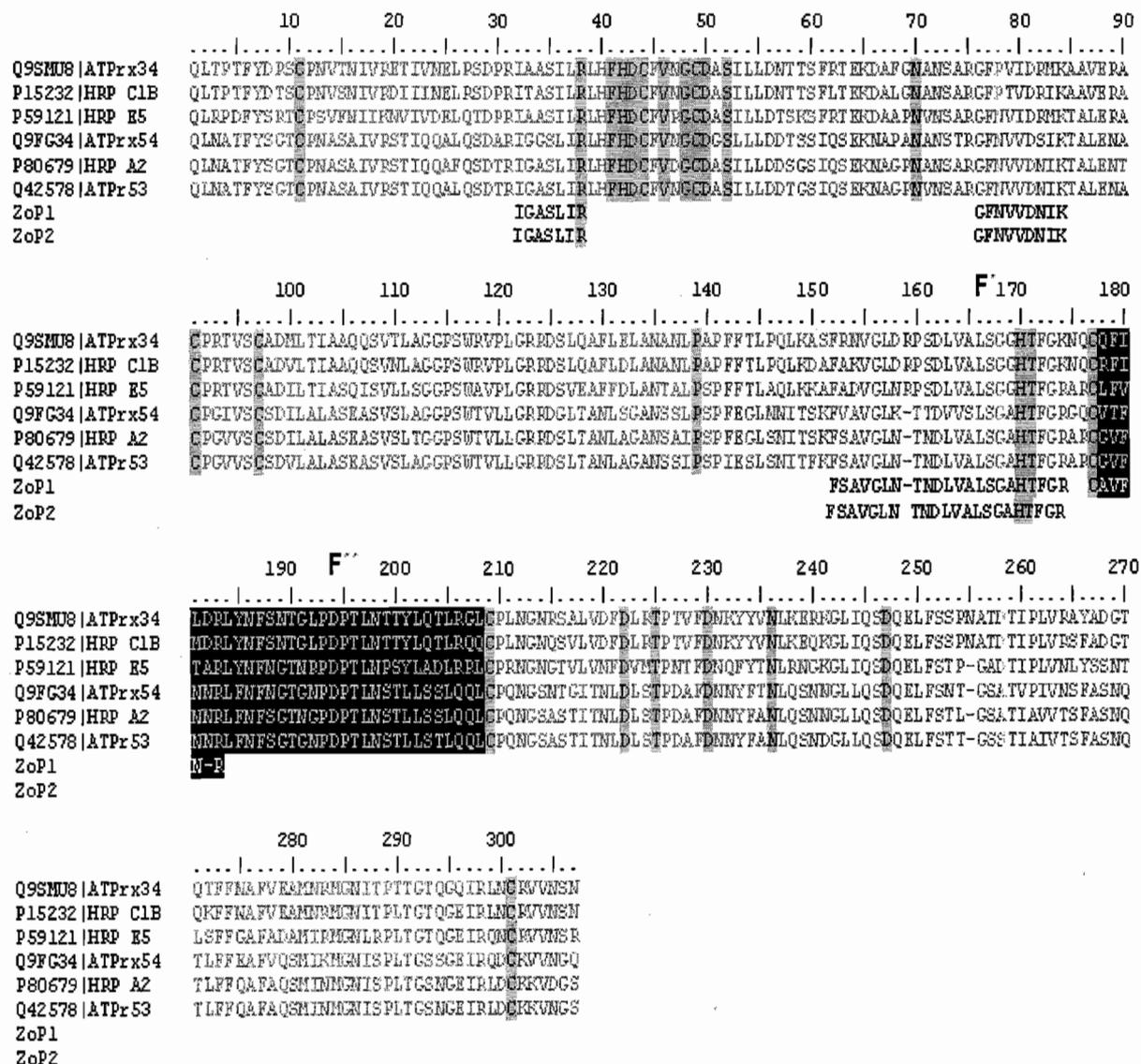


Fig. 20 Comparación de las secuencias parciales de aminoácidos de la ZoPrx1 y la ZoPrx2 con la secuencia de posibles homólogos: los residuos conservados pertenecientes al sitio activo, las 8 cisteínas y los aminoácidos de unión al Ca²⁺ están marcados con una sombra gris. La región de la hélice F'' se marca con sombra negra.

El análisis de las propiedades catalíticas de la ZoPrx se realizó tomando como referencia una de las peroxidadas con mayor similitud, la HRPA2 que se encuentra comercialmente disponible, además de que a lo largo de la historia ha sido una de las más estudiadas y con mayor estabilidad relativa al peróxido de hidrógeno en comparación a otras peroxidadas [37].

6.4 Estabilidad de ZoPrx ante el peróxido de hidrógeno

La estabilidad de la ZoPrx en el peróxido de hidrógeno se evaluó por cuatro métodos que nos proporcionan información complementaria del efecto que tiene el peróxido de hidrógeno en esta enzima.

6.4.1 Cinética de inactivación

La gran estabilidad oxidativa de la ZoPrx se hace evidente al realizar una cinética de inactivación a concentraciones catalíticas de H_2O_2 (1 mM) y en ausencia de un sustrato reductor. Bajo estas condiciones, la Zo peroxidasa mantiene el 100% de su actividad hasta por 150 min mientras que la HRPA2 tiene una vida media de 30 min. Aun más, a altas concentraciones de H_2O_2 (10 mM) y en ausencia de sustrato reductor, la Zo peroxidasa mantiene 70% de su actividad después de 150 min, mientras que la HRPA2 presenta una vida media de 17 min (Fig. 21 panel B). A una alta concentración de H_2O_2 la inactivación de la peroxidasa podría ser causada por daño oxidativo, no necesariamente ligado al mecanismo catalítico de la peroxidasa.

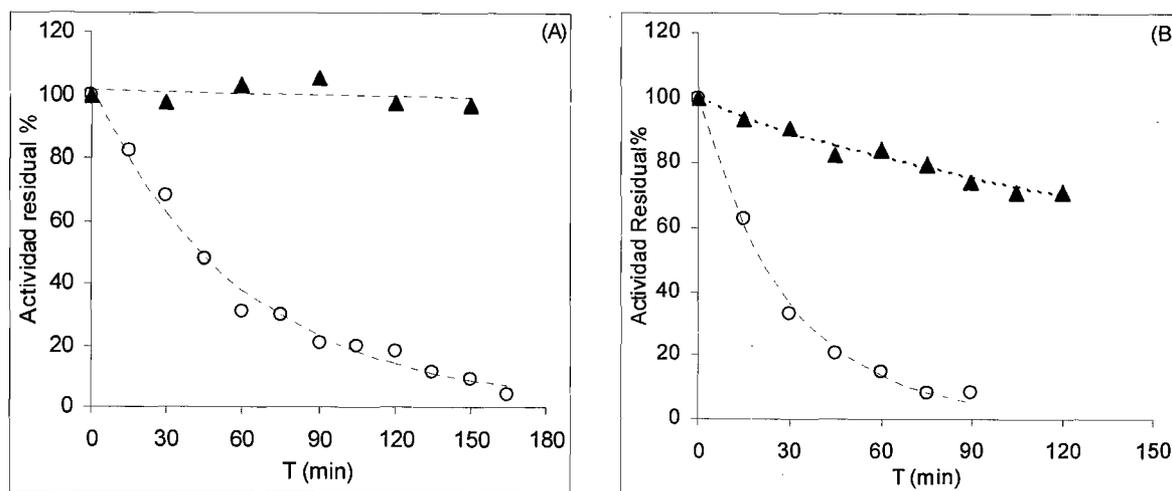


Fig. 21 Cinética de inactivación de ZoPrx (▲) o HRP A2 (○) con H₂O₂ (panel A, 1 mM; panel B, 10mM).

6.4.2 Estabilidad bajo condiciones de operación

La estabilidad de la ZoPrx demostrada con los experimentos anteriores debe reflejarse en una extensión de la vida útil de la enzima como biocatalizador bajo condiciones de operación, es decir en presencia tanto de H₂O₂ como de sustrato reductor. Para evaluar esto se monitoreó el rendimiento tanto de la ZoPrx como de la HRP A2 en presencia de ABTS y guayacol y 1 mM ó 10 mM de H₂O₂ (Fig. 22).

En presencia de guayacol y 1 mM de H₂O₂, la ZoPrx tuvo un rendimiento de 8.8×10^8 moles de producto por mol de enzima en 315 min de reacción. Este valor es 19 veces mayor que el obtenido para la HRP A2 (4.5×10^7) hasta su total inactivación a los 75 min de reacción. Con 10 mM de H₂O₂, la relación entre los rendimientos de la ZoPrx (7.6×10^8) y la HRP A2 (4.9×10^7) es similar a la anterior, con la diferencia de que los tiempos de reacción se redujeron a 100 y 50 min (Fig. 22 paneles A y B).

En presencia de ABTS y 1 mM de H₂O₂, la ZoPrx es aún más estable, pues tiene un rendimiento de al menos 4.5×10^6 moles de producto por mol de enzima sin evidencia de disminución de la actividad, aún después de 240 min de reacción. En contraste, la HRP A2 produjo solamente 1.6×10^5 moles de producto hasta su inactivación a los 180

min de reacción. El ensayo de la ZoPrx no fue monitoreado por más tiempo ya que la mezcla de reacción se encontraba saturada por el producto de la oxidación del ABTS. Con 10 mM de H₂O₂, la relación entre los rendimientos de la ZoPrx (2×10^6) y la HRPA2 (1.2×10^5) es similar a la anterior, con la diferencia de que los tiempos de reacción se redujeron a 150 y 90 min, respectivamente (Fig. 22 paneles C y D).

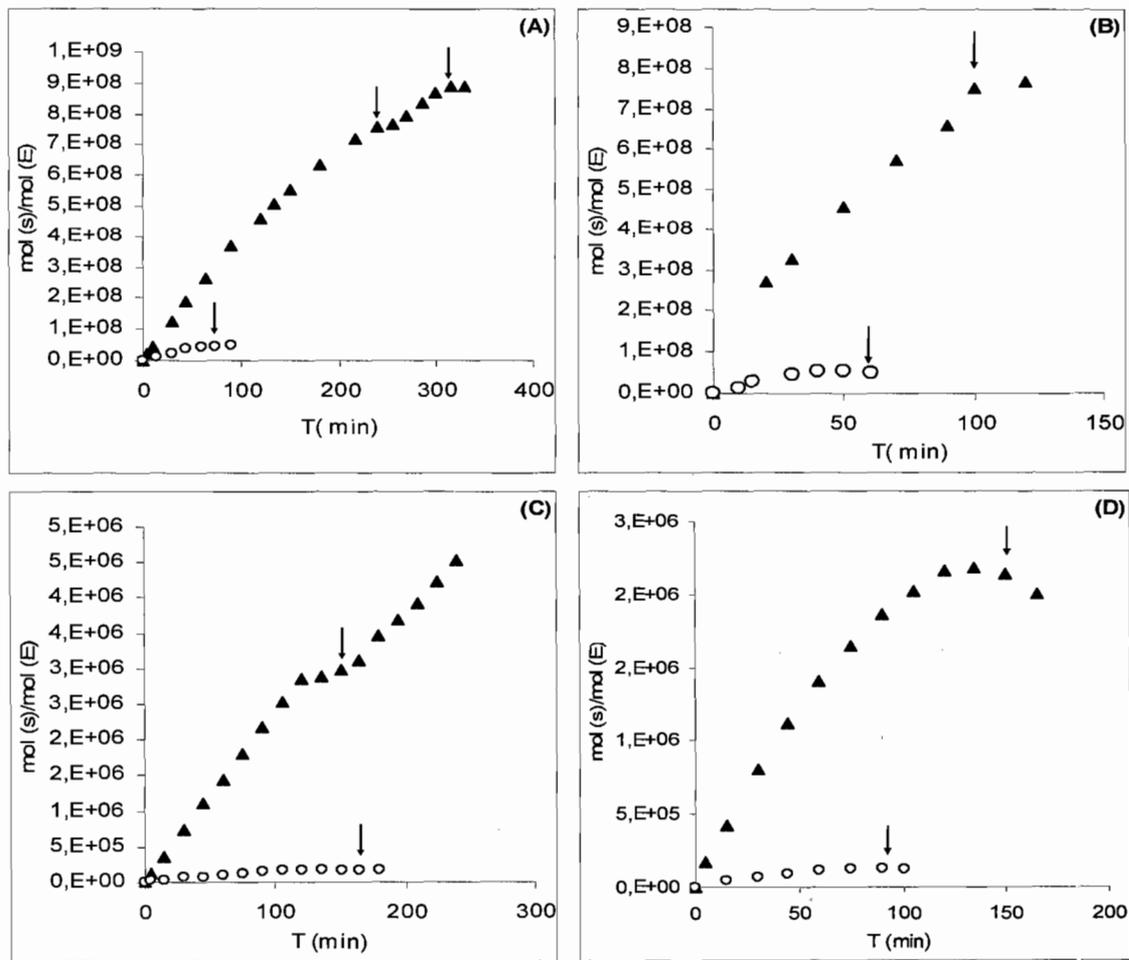


Fig. 22 Número total de recambio durante la vida útil de la enzima de ZoPrx (▲) o HRPA2 (○) en presencia de sustrato reductor (panel A y B, guayacol; panel C y D, ABTS) y dos diferentes concentraciones de H₂O₂ (panel A y C, 1 mM; panel B y D, 10 mM). Número total de recambio. Las flechas indican adiciones extras de H₂O₂ después de observar una disminución de la actividad.

6.4.3 Estabilidad oxidativa en función de la relación $[H_2O_2]/[E]$.

Se evaluó la dependencia de la estabilidad de la ZoPrx a diferentes relaciones molares $[H_2O_2]/[E]$ a 12 h de incubación (Fig. 23). La ZoPrx mantuvo el total de la actividad inicial hasta un exceso molar de peróxido de 3000 veces. Mientras que el exceso molar letal medio para la ZoPrx es de 10,000 veces, para la HRPA2 es solamente de 20 veces.

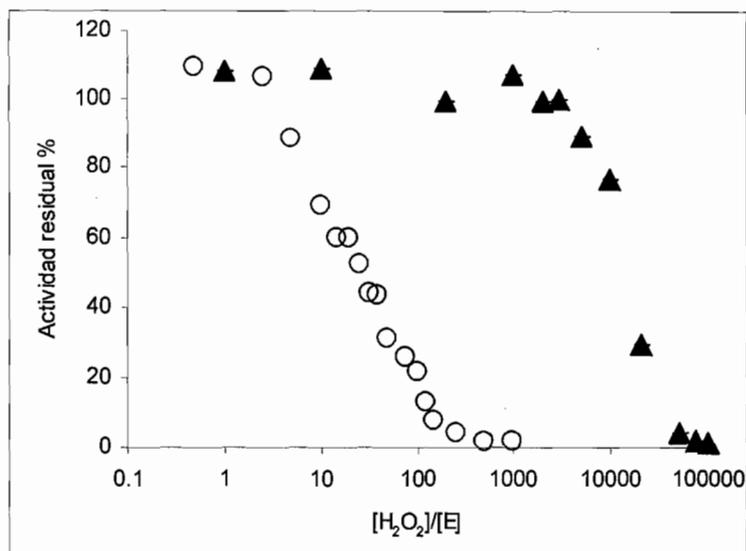


Fig. 23 Dependencia de la inactivación a la concentración de H_2O_2 de ZoPrx (▲) o HRPA2 (○). Después de 12 h de incubación la actividad residual fue estimada usando guayacol y H_2O_2 10 mM.

6.4.4 Monitoreo del grupo hemo en presencia de H_2O_2

Una de las consecuencias mejor documentadas de la inactivación oxidativa de las peroxidasas es la desaparición de la banda Soret debida a la destrucción del grupo hemo [37]. Dado que esta reacción está ligada al mecanismo catalítico de las peroxidasas, fue indispensable demostrar que la estabilidad operacional de la ZoPrx también confería estabilidad oxidativa al grupo hemo.

El comportamiento típico de la pérdida de la banda Soret por daño oxidativo al grupo hemo se reprodujo al someter a la HRPA2 a una incubación con 1 mM de H_2O_2

(Fig. 24 panel B). Como se puede observar en la figura, la adición del H_2O_2 provoca un desplazamiento de la banda Soret de 405 nm a 415 nm indicando la formación del compuesto III. En 110 minutos de incubación, más del 70 % de la banda Soret ha desaparecido. La banda Soret de ZoPrx también sufre un desplazamiento en respuesta a la adición de peróxido de hidrógeno hacia los 415 nm, indicando la formación de una especie similar al Compuesto III de la HRP A2. De manera inusual, el espectro de la ZoPrx durante la incubación sufre una serie de desplazamientos secuenciales que no llevan a la decoloración.

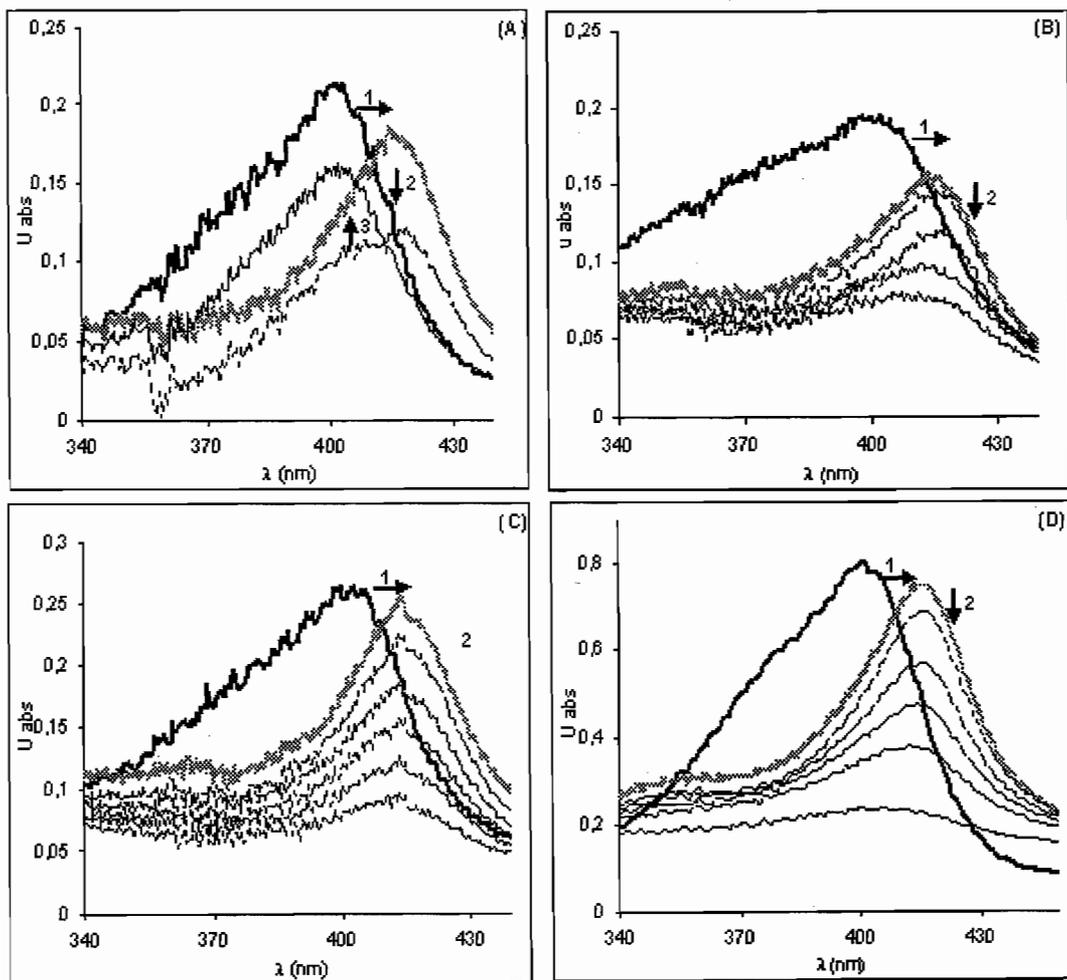


Fig. 24 Monitoreo del espectro de la banda Soret de ZoPrx (panel A y C) y HRP A2 (panel B y D) a 1 mM (panel A y B) y 10 mM (panel C y D) de H_2O_2 . Las flechas indican desplazamientos consecutivos de la banda Soret.

El desplazamiento inicial de la banda Soret a 415 nm se completa en los primeros 3 minutos de reacción y permanece invariante por 15 min. Posteriormente, esta banda comienza a disminuir lentamente durante 5 horas mientras que se observa como empieza a reaparecer la banda a 403 nm (Fig. 24 panel A). La intensidad inicial de la banda de 403 nm se recupera después de 20 horas de incubación. Además de que también se recupera la totalidad de la actividad inicial.

La decoloración del Compuesto III de la HRPA2 es todavía más evidente si se incuba en presencia de 10 mM de H₂O₂ (Fig. 24 panel D) disminuyendo el tiempo necesario para la pérdida del 70 % de la banda Soret a solamente 12 min. Interesantemente, la banda Soret de ZoPrx también se decolora bajo estas condiciones, con la diferencia de que la pérdida del 65% de la intensidad del Soret se observa hasta después de 170 min, siendo aún considerablemente más estable que la HRPA2 (Fig. 24 panel C). El daño oxidativo causado por el peróxido a estas concentraciones podría ser por factores que no estén relacionados con la catálisis de la enzima, causando daño directo a la proteína.

6.5 Estimación de la actividad endógena de catalasa por evolución de oxígeno molecular

Uno de los factores de protección que se ha relacionado con la resistencia a la inactivación por peróxido es la actividad de catalasa que presentan algunas peroxidases como la Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* y la HRPA2 [37]. Debido a que la actividad de catalasa compite por el H₂O₂ disponible tanto para realizar la reacción de peroxidasa como para llevar a la enzima a la inactivación, el tiempo de vida de la enzima aumenta cuando la actividad de catalasa es mayor.

Como resultado de su actividad de catalasa, utilizando como único sustrato al H₂O₂ a pH 6.1, la HRPA2 produjo 9.8 μM min⁻¹ de O₂, en las mismas condiciones de reacción, la ZoPrx produjo 5.5 μM min⁻¹ de O₂ (Fig. 25).

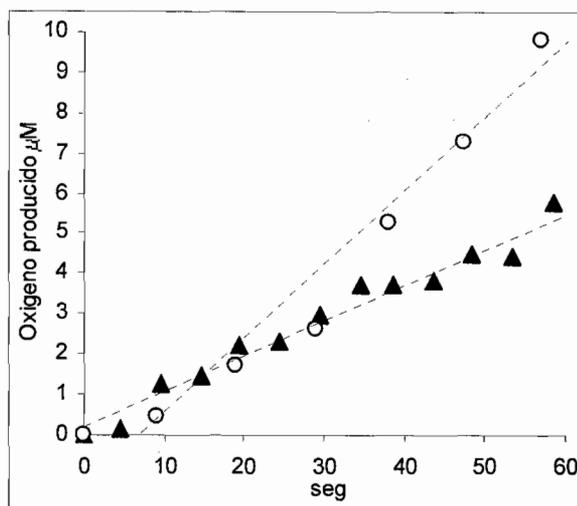


Fig. 25 Producción de oxígeno por ZoPrx (▲) o HRP2 (○) (0.1μM)

Si relacionamos el perfil de actividad de catalasa a diferentes pHs con la resistencia a la inactivación, podemos ver que en la HRP2 muestra una mayor susceptibilidad al peróxido bajo condiciones ácidas (Fig. 26, panel A). Esto correlaciona con el perfil de pH de la actividad de catalasa, ya que se sabe que a pH básico la actividad de catalasa es mayor [37]. En el caso de la ZoPrx muestra un perfil de susceptibilidad al peróxido diferente al de la HRP2, con una mayor susceptibilidad a pH 8 y 4.5, y una mayor vida media aparente a pH 6.1, aun cuando a ese pH la ZoPrx tiene una menor actividad de catalasa que la HRP2 (Fig. 26 panel B).

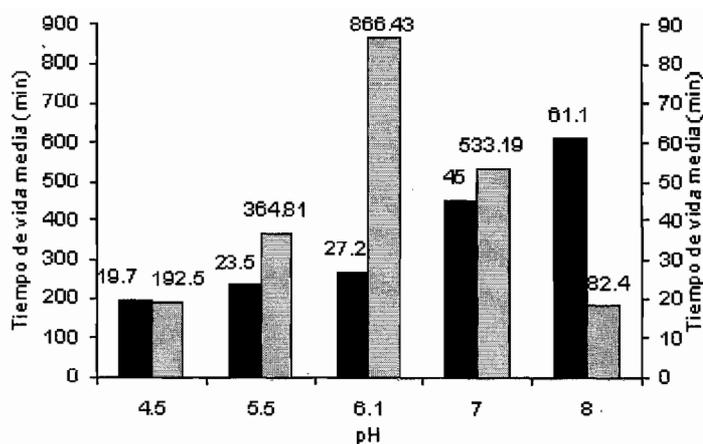


Fig. 26 Tiempo de vida media a diferentes pHs de HRP2 en negro y ZoPrx en gris.

6.5.1 Parámetros catalíticos

El fenómeno de la inactivación con el peróxido de hidrógeno está basado en el ciclo catalítico. De manera que, en principio, una isoforma muy activa sería más susceptible a inactivarse. Como consecuencia, una de las posibles causas para la estabilidad oxidativa de la ZoPrx podría ser un ciclo catalítico muy lento. Para descartar esta posibilidad se llevó a cabo la determinación de las constantes catalíticas de la ZoPrx y de la HRP2 para su comparación (Tabla 3). Las constantes de afinidad (K_M) determinadas para diferentes sustratos en la ZoPrx son un orden de magnitud mayores que las de la HRP2. Sin embargo, las constantes cinéticas globales (k_{cat}) en la Zo peroxidasa son mayores que en la HRP2. Estos resultados sugieren que la estabilidad de la ZoPrx es independiente de su eficiencia catalítica, ya que en un determinado tiempo, el número de conversiones del sustrato es similar al de la HRP2

Tabla 3. Parámetros catalíticos de ZoPrx o HRP2

	H ₂ O ₂			Guayacol			TMB		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (M)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (M)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (M)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)
ZoPrx	1659	4.6x10 ⁻³	3.6x10 ⁵	2052	4.8x10 ⁻²	4.2x10 ⁴	5813	9.6x10 ⁻⁴	6x10 ⁶
HRP2	890	3.7x10 ⁻⁴	2.4x10 ⁶	1107	5x10 ⁻³	2,2x10 ⁵	1373	8.6x10 ⁻⁴	1.5x10 ⁶

6.5.2 Determinación de constantes de velocidad

Las peroxidases presentan un comportamiento cinético diferente al descrito por Michaelis-Menten pues poseen un ciclo catalítico en el que participan dos sustratos en un proceso de tres pasos, además de que las reacciones de formación de los diferentes estados catalíticos no son reversibles. Por estas razones, la forma más adecuada para describir el estado cinético del ciclo catalítico de las peroxidases es mediante de la determinación de las constantes k_1 y k_3 de la ecuación 2 (en Metodos). Las constantes k_1 y k_3 para ZoPrx o HRPA2 en presencia de ABTS o guayacol son diferentes (Tabla 4). En la ZoPrx la constante k_1 es un orden de magnitud mayor que la HRPA2 usando cualquiera de los dos sustratos reductores, mientras que la constante k_3 es en un orden de magnitud menor. Ya que típicamente k_2 es mucho mayor que k_3 , 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.

Tabla 4. Constantes de velocidad del ciclo catalítico de ZoPrx o HRPA2. k_1 ($M^{-1} s^{-1}$) k_3 ($M^{-1}s^{-1}$)

	ABTS		Guayacol	
	k_1	k_3	k_1	k_3
ZoPrx	7.6×10^5	5.6×10^4	4.31×10^5	1.7×10^4
HRPA2	2.7×10^4	3.1×10^5	6.5×10^4	7.5×10^5

6.6 Identificación espectroscópica de las especies catalíticas

Las diferentes especies catalíticas formadas durante los tres pasos del ciclo catalítico se pueden identificar espectroscópicamente dándonos un panorama del comportamiento catalítico de estas enzimas.

En la HRPA2 se identificó con la reacción de 1eq de H_2O_2 , la formación de compuesto I con la disminución de la señal de la banda Soret a 403 nm y 505 nm. Con la adición de 2 eq. del sustrato reductor p-cresol, la señal en el espectro regresa al estado basal completando el ciclo catalítico (Fig. 27, panel a). El no observar el espectro

del paso por el compuesto II se debió probablemente a que la reacción del paso del compuesto I al compuesto II y del compuesto II al estado basal ocurre en un tiempo menor al requerido para detectarlo en el espectro.

En la reacción de la ZoPrx con 1 eq. de H_2O_2 se observó la formación del Compuesto I, similar al que se observó en la HRPA2. Al adicionarle 1 eq. de p-cresol, el máximo de la banda Soret se desplaza a 418nm, indicando la presencia del Compuesto II. El ciclo fue completado con una nueva adición de 1 eq. de p-cresol, regresando al estado basal (Fig. 27 panel B).

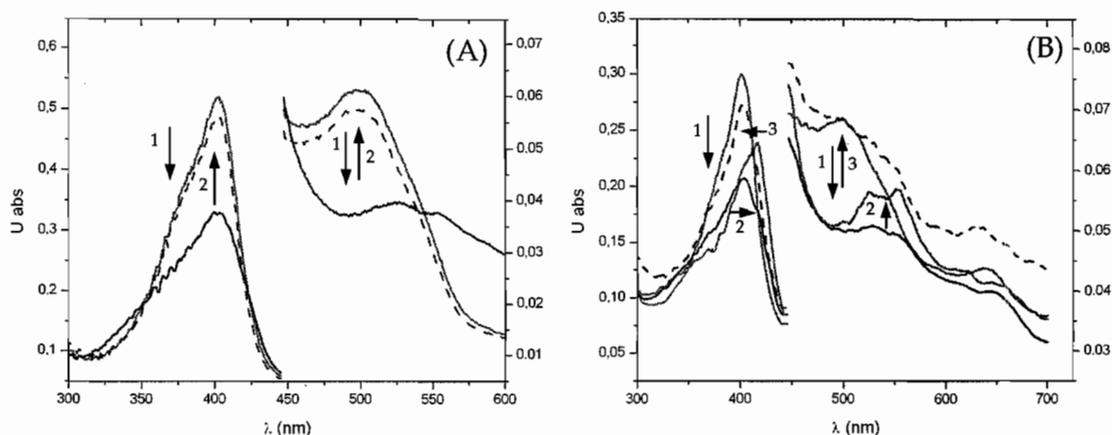


Fig. 27 Monitoreo del espectro del ciclo catalítico de a) HRPA2 b) ZoPrx. Las flechas indican el desplazamiento consecutivo de la banda Soret con adiciones sucesivas de: 1) 1 eq. de H_2O_2 , 2) y 3) 1 eq. de p-cresol. La línea roja continua, indica el estado basal sin la adición de sustratos; la línea azul, la formación de Compuesto I, línea verde formación de Compuesto II; la línea roja discontinua, el regreso al estado basal después de haber completado un ciclo de reacción.

Considerando la información de las constantes catalíticas junto con el seguimiento del ciclo en el espectro, podemos argumentar que la ZoPrx conserva el mecanismo catalítico clásico de tres pasos con la formación de los Compuesto I y II, muy similares a los observados en otras hemo peroxidases de la clase III. Sin embargo, la velocidad de formación de estas especies es diferente entre la ZoPrx y la HRPA2 (Tabla 3). En la HRPA2, al presentar $k_3 > k_1$, se puede decir que el paso limitante del ciclo es el paso del estado basal al Compuesto I. En contraste, en la ZoPrx se determinó

que $k_1 > k_3$ por lo que los pasos limitantes de la reacción son los que involucran la oxidación del sustrato reductor (Fig. 28).

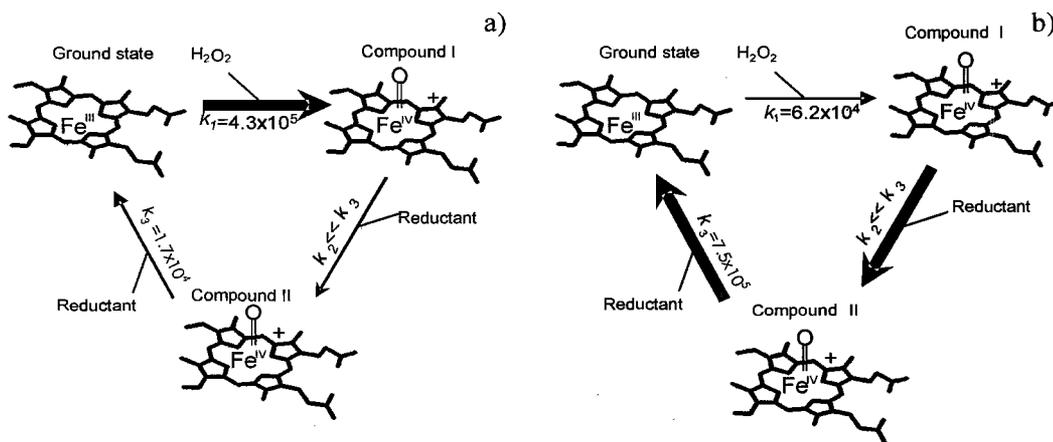


Fig. 28 Esquema de la cinética del ciclo catalítico de A) ZoPrx B) HRP2.

7. Discusión de resultados

En este trabajo se realizó la caracterización de la ZoPrx, una novedosa peroxidasa intrínsecamente resistente a la inactivación por peróxido de hidrógeno. Esta enzima fue purificada del rábano japonés *R. sativus* L. var. Daikon y fue identificada como una hemo proteína debido a su banda Soret a 403 nm. Es una especie monomérica con una masa molecular de 47 KD y punto isoeléctrico a pH 4. En investigaciones realizadas previamente por Morita [38;39] se identificó una variedad de isoperoxidasas a partir de esta misma planta; sin embargo, ninguna de ellas coincide con las propiedades de la ZoPrx. Esto seguramente se debe a que ZoPrx representa menos del 2% de la actividad de peroxidasa total y solamente al fraccionarla puede ser identificada plenamente.

Al rastrear las bases de datos de proteínas con la secuencia parcial de la ZoPrx, identificamos como sus homólogas más cercanas a las peroxidases ácidas ATPrx53 de *A. thaliana* y HRPA2 de *A. rusticana*. Basados en esta comparación, identificamos en nuestros fragmentos dos grupos de residuos altamente conservados, uno del lado distal al hemo y otro del proximal. Ambos grupos son indispensables para la catálisis y confirman la identidad de nuestra proteína como una hemo peroxidasa clase III. Del lado distal, los residuos equivalentes a Arg 38 y His 47 podrían participar en el mecanismo de formación del compuesto I, mientras que la posición equivalente a His 170 podría coordinar al grupo hemo determinando su configuración electrónica y su potencial redox [14;16]. También se identificó un tracto de seis residuos que corresponde a la zona variable de la hélice F'', y que podría ser usado para la identificación de esta proteína entre las múltiples isoformas presentes en las raíces del rábano japonés.

Los resultados de la evaluación de estabilidad oxidativa confirmaron, de manera sistemática, la superioridad de la ZoPrx respecto a su homóloga estructural, la HRPA2. Es importante recalcar que en estudios realizados por otros autores se había

documentado que la HRP2 era la isoperoxidasa de plantas más estable a inactivación oxidativa conocida [37].

Desde el principio de este trabajo se consideró que la estabilidad oxidativa de la ZoPrx pudiera deberse a uno de dos factores: que la secuencia, y por lo tanto la estructura, de esta enzima fuera sustancialmente diferente a la de sus homólogas hábiles, o que fuera consecuencia de una peculiaridad del mecanismo de reacción. Consideramos que la identificación de regiones equivalentes para la catálisis reconocidas en peroxidases lábiles, indica que su estabilidad oxidativa de la ZoPrx podría no estar conferida por una estructura significativamente diferente, sino que apunta a que puede deberse a elementos discretos, posiblemente catalíticos.

Sabemos que el mecanismo de inactivación está ligado al mecanismo catalítico, por lo que se pretendió descartar que la resistencia oxidativa fuera la consecuencia trivial de una baja eficiencia en el ciclo catalítico mediante la comparación de los parámetros catalíticos de la ZoPrx con los de la HRP2. Nuestros datos indican que a pesar de que la eficiencia catalítica en ambas enzimas es similar, existen importantes diferencias en la cinética de su ciclo catalítico, según los valores calculados para las constantes k_1 y k_3 y el seguimiento espectroscópico de las especies catalíticas. Mientras que el paso limitante en la reacción de la HRP2 es la formación del compuesto I, el paso limitante para la ZoPrx es el regreso al estado basal. Esta diferencia puede estar dada por diversas razones: 1) que en la ZoPrx el potencial redox de los compuestos I y II sea menor que en la HRP2; 2) que la ZoPrx tenga características estructurales que no permitan un rápido acceso del sustrato al hemo, o 3) que existan diferencias en la configuración los ligandos que interaccionan con el sustrato para llevar a cabo su oxidación.

Sin duda la especie catalítica más importante para este proyecto es el Compuesto III, una especie altamente oxidante que parece ser el precursor universal de las múltiples vías de inactivación. Según nuestras observaciones espectroscópicas, el Compuesto III de la ZoPrx decae al estado basal sin causar daño oxidativo, en claro

contraste con lo observado en la HRP2, donde la formación del Compuesto III conlleva irreversiblemente a la inactivación.

Ya que el mecanismo de inactivación se relaciona con la transferencia de electrones entre un grupo altamente oxidante, como es el Compuesto III, y un grupo donador de electrones, el comportamiento que presenta el compuesto III en la ZoPrx nos hace pensar que el potencial redox de este compuesto no es suficiente para oxidar a los elementos susceptibles en la proteína, aunque si es capaz de oxidar a un sustrato exógeno. Otra posibilidad es que las diferentes vías por las que se transfieren los electrones o los elementos susceptibles a la oxidación en otras peroxidasas se encuentren modificados en la ZoPrx, de tal manera que no permita su oxidación. Finalmente puede deberse a una muy alta estabilidad del aducto peroxilferril a la disociación unimolecular.

Una diferencia notable entre la ZoPrx y la HRP2 es su perfil de inactivación ante diferentes condiciones de pH. En la HRP2 este comportamiento esta relacionado con el perfil de la actividad de catalasa, ya que al aumentar la basicidad del medio la actividad de catalasa aumenta, así como su resistencia a la inactivación. En contraste, en la ZoPrx se observa una mayor estabilidad a pH 6.1 con una actividad de catalasa menor que la de la HRP2 al mismo pH. Con esto podemos decir que la estabilidad de la ZoPrx no es producto de la protección de su actividad de catalasa.

8. Conclusiones

La ZoPrx es una hemo peroxidasa ácida con características típicas de las hemo peroxidasas de plantas, con glicosilaciones, con una señal en el espectro de su grupo hemo a 403 nm, además de que tiene aminoácidos conservados que forman parte del sitio activo. Forma los dos intermediarios del ciclo catalítico y el Compuesto III, un intermediario que lleva a las hemo peroxidasas clásicas a la inactivación, además de poseer una alta eficiencia catalítica.

A pesar de todas estas similitudes con otras hemo peroxidasas, la ZoPrx presenta una resistencia a la inactivación con el peróxido de hidrógeno que hasta ahora no había sido descrita. La ZoPrx se erige como una enzima con un amplio potencial para su uso como biocatalizador o para ser tomada como un modelo para el diseño de nuevos biocatalizadores.

9. Perspectivas

A pesar del gran desarrollo que han tenido la bioquímica, la biofísica y la biología molecular, elucidar el mecanismo molecular de las hemo peroxidasas ha sido un trabajo extraordinariamente complejo, ya que son múltiples los factores que intervienen [25]. Al contar con una enzima con un comportamiento catalítico como el de las peroxidasas comúnmente estudiadas y con una característica tan peculiar de estabilidad, se tiene un nuevo recurso de información que nos ayudará, conjuntamente con el conocimiento que ya se ha generado sobre estas enzimas redox, para plantear un mecanismo molecular que relacione la estructura y función de las peroxidasas intrínsecamente estables.

Son varias las enzimas que se han tomado como modelos importantes de hemo peroxidasas, como por ejemplo la Citocromo c peroxidasa de levadura [43] y la HRPC [11], que además fueron las primeras hemo peroxidasas caracterizadas. Sin embargo, es importante considerar que ninguna enzima representa a todas las peroxidasas. Por ejemplo, la HRPC contiene enlaces disulfuro, iones calcio y grupos glicosilo, mientras que la Citocromo c peroxidasa no los tiene, aún más, presenta una estructura atípica del Compuesto I y un sustrato reductor macromolecular [16;44]. De cualquier forma estas dos peroxidasas conjuntamente con análisis más recientes de otras hemo proteínas como las peroxidasas aniónicas de HRPA2 y ATPr53, la peroxidasas Versátil de *Bjerkandera adusta*, el iso-1-citocromo c y la catalasa de *Neurospora crassa* (Cat-1), proporcionan un excelente punto de partida para abordar en general las características estructurales y cinéticas, así como la configuración electrónica del sitio activo, el análisis de los radicales libres y la posible formación de aductos.

El estudio y caracterización de estas enzimas se ha llevado a cabo por medio del uso de diferentes herramientas, desde la biología molecular hasta métodos espectroscópicos como espectroscopia uv-vis, dicroísmo circular (DC), fluorescencia, resonancia Raman, resonancia paramagnética de electrones (EPR), resonancia

magnética nuclear, espectrometría de masa, difracción de rayos x, etc. con el objetivo general de establecer una relación entre la estructura y función de estas proteínas.

10. Epítomes

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amonio
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ACN	Acetonitrilo
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspártico
ATPA2	Peroxidasa aniónica de <i>Arabidopsis thaliana</i>
BLAST	Basic Local Aligment
CcP	Citocromo c peroxidasa
Cys	Cisteina
DC	Dicroismo Circular Magnético
DTT	Ditiotreitol
EPR	Resonancia Paramagnética de Electrones
Glu	Glutámico
Gly	glicina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
Hex	Hexosa
His	Histidina
HRPA2	Peroxidasa aniónica de <i>Armoracia rusticana</i> (Horseradish peroxidasa)
HRPC	Peroxidasa catónica de <i>Armoracia rusticana</i> (Horseradish peroxidasa)
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
LiP	Lignino peroxidasa
Lys	Lisina
Met	Metionina
NaCl	Cloruro de sodio
Phe	Fenilalanina
ROS	Especies reactivas de oxígeno

Ser	Serina
Thr	Treonina
TMB	3,3',5,5'-tetametil benzidina
TPX1	peroxidasa aniónicas de tomate
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Val	Valina
ZoPrx	Zo Proxidasa

11. Bibliografía

- [1] Munro,A.W., Taylor,P., & Walkinshaw,M.D. (2000) Structures of redox enzymes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 369-376.
- [2] Nigel,C. & Smith,A.T. (2000) Horseradish peroxidase. In *Advances in Inorganic Chemistry* (Sykes,A.G., ed), pp. 108-152. Academic Press.
- [3] Passardi,F., Cosio,C., Penel,C., & Dunand,C. (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* **24**, 255-265.
- [4] Tognolli,M., Penel,C., Greppin,H., & Simon,P. (2002) Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **288**, 129-138.
- [5] Valerio,L., De,M.M., Penel,C., & Dunand,C. (2004) Expression analysis of the *Arabidopsis* peroxidase multigenic family. *Phytochemistry* **65**, 1331-1342.
- [6] Xu,F. (2005) Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Industrial Biotechnology* **1**, 38-50.
- [7] Weinryb,I. (1966) The behavior of horseradish peroxidase at high hydrogen peroxide concentrations. *Biochemistry* **5**, 2003-2008.

- [8] Cherry, J.R., Lamsa, M.H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A., Jones, A., & Pedersen, A.H. (1999) Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nat. Biotechnol.* **17**, 379-384.
- [9] Morawski, B., Quan, S., & Arnold, F.H. (2001) Functional expression and stabilization of horseradish peroxidase by directed evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **76**, 99-107.
- [10] Miyazaki, C. & Takahashi, H. (2001) Engineering of the H₂O₂-binding pocket region of a recombinant manganese peroxidase to be resistant to H₂O₂. *FEBS Lett.* **509**, 111-114.
- [11] Dunford, H.B. (1999) *Hemo peroxidases*. Wiley-VCH.
- [12] Newmyer, S.L. & Ortiz de Montellano, P.R. (1995) Horseradish peroxidase His-42->Ala, His-42->Val, and Phe-41->Ala mutants: histidine catalysis and control of substrate access to the heme iron. *J. Biol. Chem.* **270**, 19430-19438.
- [13] Welinder, K.G. (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 388-393.
- [14] Veitch, N.C. (2004) Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* **65**, 249-259.
- [15] Veitch, N.C. (2004) Structural determination of plant peroxidase function. *Phytochemistry*. **3**, 3-18.
- [16] Banci, L. (1997) Structural properties of peroxidases. *J. Biotechnol.* **53**, 253-263.
- [17] Lehman Nielsen, K., Indiani, C., Henriksen, A., Feis, A., Becucci, M., Gajhede, M., Smulevich, G., & Welinder, K.G. (2001) Differential activity and structure of highly similar peroxidases. Spectroscopic, crystallographic, and enzymatic analyses of lignifying *Arabidopsis thaliana* peroxidase A2 and horseradish peroxidase A2. *Biochemistry* **40**, 1103-11021.
- [18] Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., & Matsui, H. (2001) A large family of class III plant peroxidase. *Plant Cell Physiol.* **42**, 462-468.
- [19] Zhao, D., Gilfoyle, D.J., Smith, A.T., & Loew, G.H. (1996) Refinement of 3D models of horseradish peroxidase isoenzyme C: predictions of 2D NMR assignments and substrate binding sites. *Proteins* **26**, 204-216.
- [20] Verdin, J., Pogni, R., Baeza, A., Baratto, M.C., Basosi, R., & Vazquez-Duhalt, R. (2006) Mechanism of versatile peroxidase inactivation by Ca²⁺ depletion. *Biophys. Chem.* **121**, 163-170.

- [21] Howes,B.D., Feis,A., Raimondi,L., & Indiani,C. (2001) The critical role of the proximal calcium ion in the structural properties of horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.* **276**, 40704-40711.
- [22] Lewis,N.G. & Yamamoto,E. (1990) Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **41**, 455-496.
- [23] Passardi,F., Penel,C., & Dunand,C. (2004) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.* **9**, 534-540.
- [24] Schnabelrauch,L.S., Kieliszewski,M., Upham,B.L., Alizedeh,H., & Lamport,D.T. (1996) Isolation of pl 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr-Lys as putative intermolecular cross-link site. *Plant J.* **9**, 477-489.
- [25] Valderrama,B., Ayala,M., & Vazquez-Duhalt,R. (2002) Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chemistry & Biology* **9**, 555-565.
- [26] Hiner,A.N.P., Sidrach,L., Chazarra,S., Varón,R., Tudela,S., García-Canovas,F., & Rodríguez-López,J.N. (2003) Compound I formation in artichoke (*Cynara scolymus* L.) peroxidase is modulated by the equilibrium between pentacoordinated and 6-Aquo hexacoordinated forms of the heme and by calcium ions. *Biochemistry* **42**, 8799-8808.
- [27] Berglund,G.I., Carlsson,G.H., Smith,A.T., Szöke,H., Henriksen,A., & Hajdu,J. (2002) The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature* **417**, 463-468.
- [28] Hersleth,H.P., Ryde,U., Rydberg,P., Gorbitz,C.H., & Andersson,K.K. (2006) Structures of the high-valent metal-ion haem-oxygen intermediates in peroxidases, oxygenases and catalases. *J. Inorg. Biochem.* **100**, 460-476.
- [29] Derat,E., Cohen,S., Shaik,S., Altun,A., & Thiel,W. (2005) Principal active species of horseradish peroxidase, compound I: a hybrid quantum mechanical/molecular mechanical study. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 13611-13621.
- [30] Poulos,T.L. (2005) Intermediates in P450 catalysis. *Philos. Transact. A Math. Phys. Eng Sci.* **363**, 793-806.
- [31] Everse,J. (1998) The structure of heme proteins Compounds I and II: some misconceptions. *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 1338-1346.
- [32] Poulos,T.L. & Kraut,J. (1980) The stereochemistry of peroxidase catalysis. *J. Biol. Chem.* **255**, 8199-8205.

- [33] Hiner,A.N., Raven,E.L., Thorneley,R.N., Garcia-Canovas,F., & Rodriguez-Lopez,J.N. (2002) Mechanisms of compound I formation in heme peroxidases. *J. Inorg. Biochem.* **91**, 27-34.
- [34] Pfister,T.D., Gengenbach,A.J., Syn,S., & Lu,Y. (2001) The role of redox-active amino acids on compound I stability, substrate oxidation, and protein cross-linking in yeast cytochrome c peroxidase. *Biochemistry.* **40**, 14942-14951.
- [35] Matsunaga,I. & Shiro,Y. (2004) Peroxide-utilizing biocatalysts: structural and funtional diversity of heme-containig enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology* **8**, 132.
- [36] Henriksen,A., Smith,A.T., & Gajhede,M. (1999) The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates. *J. Biol. Chem.* **274**, 35005-35011.
- [37] Hiner,A., Hernández-Ruíz,J., Rodríguez-López,J.N., Arnao,M.B., Varón,R., & García-Cánovas,F. (2001) The inactivation of horseradish peroxidase isoenzyme A2 by hydrogen peroxide: an example of partial resistance due to the formation of a stable enzyme intermediate. *J. Biol. Inorg. Chem.* **6**, 504-516.
- [38] Morita,Y., Yoshida,C., Kitamura,I., & Ida,S. (1970) Isoenzymes of Japanese-radish peroxidase. *Agricultural and Biological Chemistry* **34**, 1191-1197.
- [39] Morita,Y., Yoshida,C., & Maeda,Y. (1971) Properties and structures of peroxidase isoenzymes of Japanese-radish. *Agricultural and Biological Chemistry* **35**, 1074-1083.
- [40] Rodríguez-López,J.N., Smith,A.T., & Thorneley,R.N.F. (1996) Role of Arginine 38 in horseradish peroxidase.A critical residue for substrate binding and catalysis. *J. Biol. Chem.* **271**, 4023-4030.
- [41] Smith,A.T., Nigel,C., & Veitch,N.C. (1998) Sustrate binding and catalysis in heme peoxidases. 128. *Current Opinion in Chemical Biology.* **2**, 269-278.
- [42] Ayala,I., Kim,S., & Barry,B.A. (1999) A Difference Fourier transform infrared study of tyrosyl radical Z* decay in photosystem II. *Biophys. J.* **77**, 2137-2144.
- [43] Finzel,B.C., Poulos,T.L., & Kraut,J. (1984) Crystal structure of yeast cytochrome c peroxidase refined at 1.7-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **259**, 13027-13036.
- [44] Frew,J.E. & Jones,P. (1983) Kinetics of yeast cytochrome c peroxidase compound I formation with modified substrates (peroxybenzoic acids). *Biochim. Biophys. Acta* **742**, 1-8.

