



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE LA
Zn-PEROXIDASA DE *Raphanus sativus* L.
DAIKON

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGA

P R E S E N T A:

NIZAÁ JIMÉNEZ ARROYO



DIRECTOR DE TESIS:
DR. ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Jiménez

Arroyo

Nizaá

Teléfono: 56 59 47 62

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

No. de cuenta: 304200775

2. Datos del tutor

Dr

Enrique

Rudiño

Piñera

3. Datos del sinodal 1

Dr

Lorenzo Patrick

Segovia

Forcella

4. Datos del sinodal 2

Dr

José Luis

Puente

García

5. Datos del sinodal 3

Dr

Alejandro

Sosa

Peinado

6. Datos del sinodal 4

M en C

Paloma Columba

Gil

Rodríguez

7. Datos del trabajo escrito

Título: Estructura cristalográfica de la Zo-Peroxidasa de *Raphanus sativus* L. Daikon

Número de páginas: 56 p

Año: 2012

*A mis padres, que me han brindado su apoyo incondicional durante toda mi vida.
Gracias por los consejos, y aún más, gracias por apoyarme en mis decisiones.*

*A mis primos, que toda mi vida han sido un punto de relajación y locura para hacer
todo más entretenido, divertido y equilibrado. Gracias por estar ahí en las buenas y
en las malas.*

*A mis amigos, de la prepa y la facultad, que a su manera, me ayudaron a
convertirme en lo que hoy soy.*

AGRADECIMIENTOS:

En especial, a mi tutor, el Dr. Enrique Rudiño Piñera, quien me guió y brindó su sabiduría, paciencia y apoyo durante toda la realización de este trabajo y más.

A la Biol. Sonia Rojas, que me ayudó y apoyó todo en el camino.

A todos mis compañeros del laboratorio de Cristalografía, quienes me enseñaron tanto.

A los miembros del jurado, por su valiosa asesoría.

A la E.N.P. No. 6, a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Biotecnología, de la U.N.A.M. por convertirse, cada uno en su tiempo, en mis templos de divertido aprendizaje.

A mis profesores, compañeros de trabajo, amigos y todos aquellos que hicieron posible que llegara hasta aquí.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	2
ACRÓNIMOS	3
1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1 <i>El grupo prostético hemo en la peroxidasa</i>	6
2.2 <i>Clasificación de las hemo-peroxidasas</i>	8
2.3 <i>Estructura de una hemo-peroxidasa de la Clase III</i>	10
2.4 <i>El calcio en las hemo-peroxidasas de las Clases II y III</i>	12
2.5 <i>Glicosilaciones en las hemo-peroxidasas</i>	13
2.6 <i>Mecanismos catalíticos de las hemo-peroxidasas</i>	14
2.6.1 <i>Estado férrico</i>	14
2.6.2 <i>Compuesto 0 y Compuesto I (radical porfirina)</i>	15
2.6.3 <i>Compuesto II</i>	16
2.7 <i>Mecanismo de inactivación de una hemo-peroxidasa</i>	17
2.8 <i>La Zo-Peroxidasa, una enzima intrínsecamente resistente al H₂O₂</i>	17
2.9 <i>Cristalografía de Rayos X de peroxidasas</i>	19
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVO	21
4.1 <i>Objetivos particulares</i>	21
5. METODOLOGÍA	22
5.1 <i>Purificación y cristalización</i>	22
5.2 <i>Colecta de datos de Rayos-X</i>	23
5.3 <i>Procesamiento de datos y afinamiento del modelo</i>	24
5.4 <i>Comparación secuencia-estructura con enzimas homólogas</i>	25
6. RESULTADOS	26
6.1 <i>Modelo cristalográfico y secuencia de la Zo-Peroxidasa</i>	26
6.1.1 <i>Discrepancias del modelo cristalográfico</i>	30
6.1.2 <i>Sitio activo, iones Ca²⁺ y puentes disulfuro</i>	32
6.1.3 <i>Glicosilaciones</i>	34
6.2 <i>Comparación secuencia-estructura de la ZoPrx con sus homólogas</i>	36

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
8. CONCLUSIÓN	50
9. PERSPECTIVAS	50
10. BIBLIOGRAFÍA	52

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1 Estructura de la ferritoporfirina IX	7
Fig. 2 Representación del ambiente del sitio activo de las hemo-peroxidasas HRP, LiP y CcP	8
Fig. 3 Diagrama general de todas las (super)familias de hemo-peroxidasas	9
Fig. 4 Estructura tridimensional de representantes de las 3 clases de la super-familia de peroxidasas-catalasas resaltando las α -hélices conservadas	11
Fig. 5 Estructura de los <i>N</i> -glicanos de plantas	13
Fig. 6 Ciclo catalítico genérico de las peroxidasas	14
Fig. 7 Representación esquemática de la formación del Compuesto 0 y Compuesto I	16
Fig. 8 Fotografía del cristal de la condición B3	24
Fig. 9 Modelo cristalográfico final de la ZoPrx	28
Fig. 10 Secuencia completa final de la Zo-peroxidasa	30
Fig. 11 Diferencias entre las moléculas A y B del modelo cristalográfico de la ZoPrx	31
Fig. 12 Sitio activo de la Zo-Prx en estado basal	32
Fig. 13 Puentes disulfuro presentes en la ZoPrx	33
Fig. 14 Estructura del <i>N</i> -glicano más largo que pudo afinarse en el modelo de la ZoPrx	34
Fig. 15 <i>N</i> -glicosilaciones presentes en la ZoPrx	35
Fig. 16 Superposición de las estructuras cristalográficas de la ZoPrx y la ATP A2	36
Fig. 17 Ambiente del hemo en la ZoPrx con los residuos que forman el bolsillo hidrofóbico	37
Fig. 18 Alineamiento estructural de la ZoPrx y las 7PXs	38
Fig. 19 Alineación múltiple de secuencias de la ZoPRX y las 7PXs	39
Fig. 20 Diagrama bidimensional de las interacciones proteína-grupo prostético de la ZoPrx	42
Fig. 21 Representaciones de la superficie electrostática alrededor del hemo de la ZoPrx, la ATP A2, la HRPC y la PNP	44
Tabla 1 Peroxidasas de la Clase III con plegamiento de PRXs de plantas	20
Tabla 2 Tabla de datos cristalográficos de la ZoPrx	27
Tabla 3 Estadística del alineamiento estructural de la ZoPrx contra las 7PXs	40

ACRÓNIMOS

(NH₄)₂SO₄	Sulfato de amonio
7PXs	Las siete hemo-peroxidasa con plegamiento de "peroxidasa de plantas", con estructura cristalográfica disponible en el PDB
a.a.	Aminoácidos
ATP A2	<i>Arabidopsis thaliana</i> peroxidasa isoenzima aniónica 2
ATP N	<i>A. thaliana</i> peroxidasa isoenzima N
BAS	Buffer de acetatos de sodio
BFS	Buffer de fosfatos de sodio
BP 1	Peroxidasa de grano de cebada
C₄H₁₀O₆Zn	Acetato de zinc
CcP	Citocromo c peroxidasa
EBI	European Bioinformatics Institute
Fuc	Fucosa
GlcNAc	N-acetilglucosamina
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HRP A2	Peroxidasa del rábano picante isoenzima aniónica 2
HRPC	Peroxidasa de rábano picante isoenzima C
LiP	Lignino peroxidasa
Man	Manosa
MES	Ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico
Ngly	N-glicosilación
PEG	Polietilenglicol
PDB	Protein Data Bank
POX	Hemo-peroxidasa de plantas o Clase III
PNP	Peroxidasa de cacahuete
PRX	Peroxidasa
RPTP	Peroxidasa de palmera real
SBP	Peroxidasa de frijol de soya
Xyl	Xilosa
ZoPrx	Zo-Peroxidasa

1. RESUMEN

Las peroxididasas son oxido-reductasas ubicuas capaces de romper los enlaces peroxídicos heterolíticamente. Las peroxididasas presentes en plantas forman un grupo bastante estudiado de hemo-enzimas a las cuales se les han atribuido y comprobado muchas funciones biológicas, por lo que poseen un amplio número de aplicaciones potenciales en la industria. El entender su diversidad enzimática y su significancia funcional es un punto clave en estudios mecanísticos y estructurales de estas peroxididasas.

La Zo-Peroxidasa (ZoPrx) es una enzima ácida perteneciente a la Clase III de peroxididasas secretadas por plantas, la cual difiere de todas las demás peroxididasas de esta clase debido a que posee una gran estabilidad catalítica en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno. En este trabajo presentamos la estructura cristalográfica de la ZoPrx aislada de las raíces del rábano japonés (*Raphanus sativus* L. Daikon), afinada a una resolución de 2.05 Å. La proteína madura consiste de un monómero de 308 residuos de aminoácidos y posee el mismo tipo de plegamiento que exhiben todos los miembros de la súper-familia de peroxididasas de plantas, conteniendo un grupo hemo, específicamente una ferriprotoporfirina IX, como grupo prostético y dos sitios de unión a calcio en posiciones similares. Además se localizaron siete sitios de *N*-glicosilación. Al compararse esta nueva proteína con enzimas homólogas tales como la peroxidasa aniónica 2 de *Arabidopsis* y la peroxidasa del rábano picante, se identificaron varias diferencias estructurales, de las cuales la más sobresaliente es la variación de un residuo de aminoácido que se encuentra al final del canal de acceso del sustrato hacia el grupo hemo.

Debido a que es altamente resistente a la inactivación en presencia de 10 mM H₂O₂, la ZoPrx tiene un amplio rango de aplicaciones potenciales, por lo que su estructura tridimensional se vuelve de gran interés como posible punto de partida para diseñar hemo-peroxididasas con mayor estabilidad oxidativa.

2. INTRODUCCIÓN

Las enzimas (del gr. ἔνζυμο[en] y ζύμη[zymee], “en la levadura”, término acuñado por Wilhelm Kuhne en 1878) son proteínas catalíticas cuya función es incrementar la velocidad de ciertas reacciones químicas, y que comparten varias características principales: Son los catalizadores más eficientes, necesitándose cantidades minúsculas -del orden micromolar- para acelerar una reacción; Además su actividad es específica, es decir que la mayor parte de las enzimas reaccionará sólo con un sustrato o grupo de sustratos específico; Y que para la gran mayoría de las enzimas (las alostéricas), su actividad está regulada, o sea que pueden cambiar alternativamente su estado de actividad, de bajo a alto y viceversa [Bohinski, 1991]. Es por eso que la estabilidad, actividad y especificidad de una enzima son los parámetros fundamentales a considerar en el desarrollo de una aplicación industrial [Ayala & Torres, 2010].

Las enzimas conocidas como **peroxidasas** (PRXs) son oxido-reductasas presentes en bacterias, hongos, plantas y animales, que son capaces de emplear peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para catalizar la oxidación de una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos (que van desde otra proteína, a pequeñas moléculas aromáticas, o desde polímeros grandes, hasta iones inorgánicos).

Las PRXs llevan tiempo siendo objeto de interés desde una perspectiva biotecnológica. Fue gracias al trabajo de James Sumner sobre una peroxidasa, la ureasa de frijol, que se comprobó la actividad catalítica de las proteínas, dándole así a las peroxidasas un papel central en el desarrollo de la enzimología moderna [Dunford, 1999]. Estas proteínas poseen una amplia variedad de aplicaciones, desde síntesis química hasta biocatálisis ambiental. Estos biocatalizadores son capaces de catalizar reacciones tales como la oxidación de heteroátomos (oxidación de N y S), la hidroxilación, la epoxidación y la oxidación de alcoholes e indol, usualmente con altos rendimientos y valores de exceso enantiomérico [Alvarado & Torres, 2009].

Para poder desarrollar procesos de biocatálisis basados en PRXs, es necesario tomar en cuenta tanto criterios operacionales como factores económicos. Es imperativo el desarrollar sistemas de expresión eficientes y de bajo costo para PRXs; Tanto su actividad como estabilidad debe aumentar para que estos biocatalizadores puedan competir contra las tecnologías químicas convencionales existentes [Ayala & Torres, 2010].

2.1 El grupo prostético hemo en la peroxidasa

El grupo hemo es un grupo prostético ampliamente utilizado en la naturaleza para llevar a cabo diversas funciones biológicas. Las enzimas que lo contienen (hemo-enzimas) realizan principalmente dos funciones: 1) La catálisis de reacciones redox dependientes de peróxido/oxígeno (p.e. citocromos P450, catalasas y peroxidasa); Y 2) El transporte y almacenamiento de oxígeno (p.e. hemoglobina y mioglobina). Además participan en la unión a ligandos, transducción de señales y en el control de la expresión genética [Paoli *et al.*, 2002].

Las PRXs se han clasificado en tres grupos dependiendo de la naturaleza de su sitio activo; Están las vanadio-peroxidasa, que poseen un ion de vanadio en su sitio activo, y se encuentran principalmente en organismos marinos. Después están las peroxidasa no-metálicas, que requieren un *buffer* de acetato o propionato para activarse, las cuales se hayan en bacterias [Valderama *et al.*, 2002]. Por último, para las PRXs conocidas como **hemo-peroxidasa**, que están presentes en la mayoría de los seres vivos, su grupo prostético es un grupo hemo, específicamente la ferriprotoporfirina IX, comúnmente conocido como hemo b [Banci, 1996]. Este grupo hemo consta de una parte orgánica que coordina a un átomo de hierro. La parte orgánica es la protoporfirina y está formada por cuatro grupos pirrólicos, que están unidos por medio de puentes meteno y que forman un anillo tetrapirrólico. En el centro se haya un Fe^{3+} el cual desplaza a dos átomos de hidrógeno originalmente unidos a los nitrógenos de los pirroles [Dunford, 1999].

El grupo hemo b en PRXs presenta al menos cinco estados de oxidación, siendo uno de ellos el estado basal, donde el ion hierro está en estado de oxidación 3+. Dicho hierro se encuentra penta-coordinado; las posiciones 1-4 están ocupadas por cuatro nitrógenos de pirrol del anillo tetrapirrólico, siendo la quinta posición, ubicada en la parte proximal del hemo, ocupada generalmente por un nitrógeno de la cadena lateral de imidazol de un residuo de histidina; Muy pocos residuos de aminoácidos (a.a.) que no sean His están involucrados en hemo-enzimas penta-coordinadas, tal es el caso de la cloroperoxidasa que contiene una cisteína. Por último, la sexta posición de coordinación en la parte distal se encuentra libre en el estado basal de la enzima [Banci, 1996]. Es en esta región, la cavidad distal del grupo prostético, en donde las reacciones de peroxidasa toman lugar [Dunford, 1999].

De igual forma, para casi todas las PRXs de plantas el grupo prostético es la ferriprotoporfirina IX (hemo b), el cual presenta 8 cadenas laterales: Cuatro grupos metilos en las posiciones 1, 3, 5, y 8; Dos grupos vinilos, en las posiciones 2 y 4; Y dos grupos propionato, en las posiciones 6 y 7. Los puentes meteno entre los pirroles se denotan como α , β , γ y δ , estando

localizado el carbono α entre las cadenas laterales 2 y 3 [Dunford, 1999]. Lo anterior se ilustra en la fig. 1

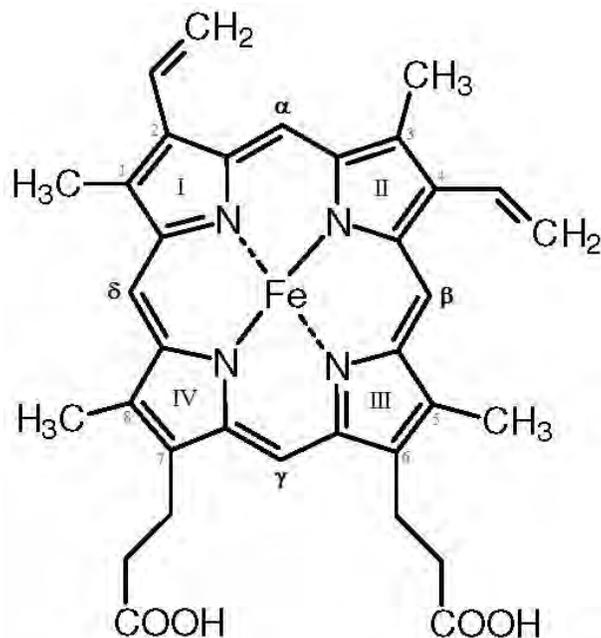


Figura 1. Estructura de la ferritroporfirina IX.

A pesar de la baja identidad de secuencia de a.a. entre todas las PRXs (<20%), la coordinación del hierro y la mayoría de los residuos en el sitio activo están completamente conservados. El hierro forma un enlace muy fuerte con el N_{E2} de la histidina proximal. Esta histidina proximal contribuye al potencial de reducción bajo y negativo del hierro, el cual estabiliza estados de oxidación altos, siendo esto último una característica necesaria para la estabilización de las especies activas conocidas como Compuesto I y II [Banci, 1996]. La fig. 2 muestra el sitio activo de las hemo-peroxidasas más estudiadas, la peroxidasa de rábano picante (HRP), la lignino peroxidasa (LiP) y la citocromo c peroxidasa (CcP) con los residuos más relevantes.

En todas las PRXs se encuentra un canal principal de acceso al hemo, el cual le permite al H_2O_2 alcanzar al ion hierro para activar a la enzima, pero también admite la entrada de pequeños sustratos reductores, tal como sucede en la HRP y en la peroxidasa del hongo *Coprinopsis cinerea* (CIP) [Ruiz-Dueñas & Martínez, 2010]. Este canal principal desemboca en la cavidad de la enzima en la cual se encuentra embebido el hemo, formada por una parte distal y otra proximal. La cavidad distal es el sitio de interacción del H_2O_2 y se caracteriza por tener dos residuos de a.a. completamente conservados, la histidina y la arginina distales [Welinder & Gajhede, 1993] las cuales producen un bolsillo hidrofílico, siendo esto otra característica distintiva de las PRXs. En la

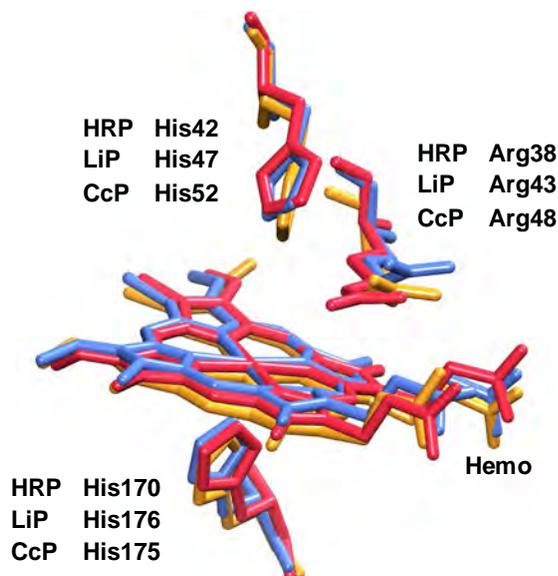


Figura 2. **Representación del ambiente del sitio activo de las hemo-peroxidasas HRP** (rosa fuerte), **LiP** (naranja), y **CcP** (azul) con la localización de sus residuos catalíticos. Se muestran el grupo hemo, la histidina proximal (abajo), y la histidina y arginina distales (arriba).

cavidad proximal se localiza la His proximal. La penta-coordinación del hierro está determinado tanto por la presencia del ligando hierro-His proximal, el cual mueve al hierro hacia fuera del plano del hemo, previniendo así la unión de una molécula de agua a la posición axial del grupo prostético, como por las mismas propiedades de la cavidad distal [Banci, 1996]. En la HRP, el grupo hemo está protegido por los residuos de las cavidades distal y proximal que lo rodean, con solo el borde δ -*meso* expuesto al medio; El ion hierro está protegido, entre otros, por la His distal y la Phe (o Trp, dependiendo de la PRX) adyacente. Estas restricciones estéricas impuestas en el sitio activo que comparten todas las PRXs, previenen reacciones de transferencia de oxígeno por aquellos sustratos más grandes por solo uno o dos átomos. Además esta topología particular restringe las interacciones enzima-sustrato al borde expuesto del hemo [Ortiz de Montellano, 2010].

2.2 Clasificación de las hemo-peroxidasas

De acuerdo a la identidad de sus secuencias y estructuras, las hemo-peroxidasas se han dividido filogenéticamente en dos súper-familias (ver fig. 3); La primera incluye a las enzimas de vertebrados, y es conocida como la súper-familia de peroxidasas-ciclooxigenasas [Zamocky *et al.*,

2008], mientras que la segunda, que agrupa las enzimas de bacterias, hongos y plantas, es llamada la súper-familia de peroxidasa-catalasas. Adicionalmente existen 3 familias; La familia de las di-hemo peroxidasa, la de las hemo tipo dyp peroxidasa, y la familia de las haloperoxidasas [Zamocky & Obinger, 2010].

La súper-familia de las peroxidasa-catalasas es la más estudiada hasta el momento. Los integrantes de ésta súper-familia, los cuales presentan un plegamiento y estructura secundaria conservados [Battistuzzi, 2010], se dividen en tres clases: La Clase I, que está integrada por enzimas procariontes intracelulares (p.e. la CcP de levadura); La Clase II, que agrupa a las enzimas extracelulares de hongos (p.e. la LiP); Y la Clase III, que está conformada por peroxidasa secretadas por plantas (p.e. la HRP) [Welinder, 1992; Hiner *et al.*, 2002]. Esta última clase será abreviada de aquí en adelante como POXs.

La Clase I (EC 1.11.1.5 y 11 y 21) contiene mayoritariamente enzimas citocromo c peroxidasa, ascorbato peroxidasa, y catalasa-peroxidasa bacterianas. La Clase II (EC 1.11.1.13 y 14) está dominada por manganeso y lignino peroxidasa fúngicas. La Clase III o POXs (EC 1.11.1.7) está representada por peroxidasa secretadas por plantas relacionadas con la HRP [Zamocky & Obinger, 2010]. Recientemente se ha demostrado que algunos miembros de la súper-familia también se encuentran representados en los genomas de *Hydra viridis* y algunas especies relacionadas del phylum Cnidaria [Habetta & Bosch, 2005].

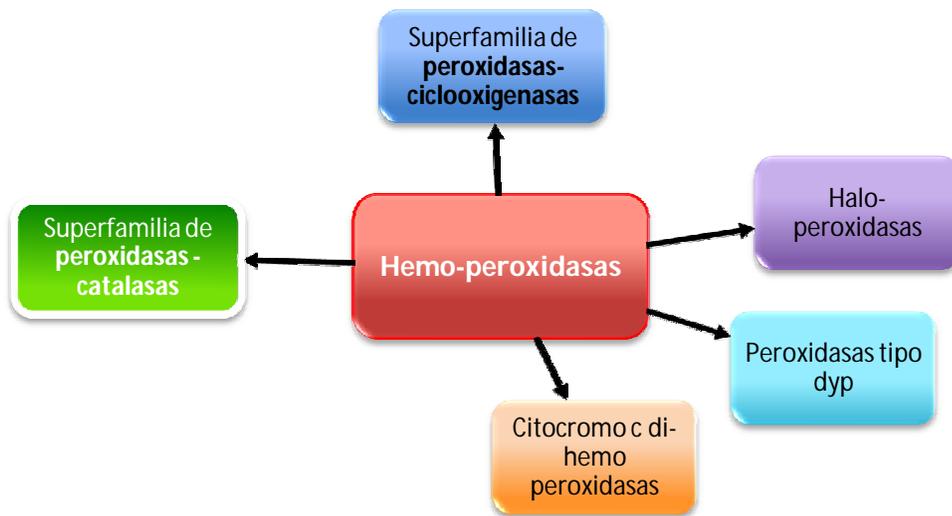


Figura 3. Diagrama general de todas las (súper)familias de hemo-peroxidasa.

La estructura cuaternaria de las peroxidases-catalasas (p.e. el número de subunidades o cadenas) varía dependiendo de la proteína, sin embargo, todos los monómeros de PRXs comparten características estructurales similares [Kunishima *et al.*, 1994]. El mayor componente estructural secundario en todos los integrantes de las 3 clases es la α -hélice, mientras que sólo presentan una pequeña región de hojas- β . Se encuentran 10 α -hélices (nombradas de la A a la J) con posiciones similares en todos los miembros, localizándose al hemo entre las hélices B y F. Las Clases I y II poseen una hélice pequeña adicional llamada B' entre las hélices B y C, mientras que en la Clase III, puede presentarse una hélice 3_{10} en su lugar. Además las PRXs de la Clase III presentan 3 hélices adicionales llamadas D' (entre las hélices D y E), F' y F'' (ambas entre las hélices F y G) [Dunford, 1999]. El segmento localizado entre las hélices F y H, junto con los extremos N- y C-terminal, son de las regiones con mayor variación entre las peroxidases, con respecto tanto a las estructuras tridimensionales como a los alineamientos de secuencias [Schuller *et al.*, 1996]. En la fig. 4 se ilustran las posiciones de las hélices A-J, B', D', F' y F'' en sus respectivas clases de PRXs. El plano del grupo hemo divide al monómero de las peroxidases en dos dominios; El dominio I (o distal, arriba del hemo), que consiste de las hélices A-D, y el dominio II (o proximal, por debajo del hemo), que consiste de las hélices F-J. Ambos dominios están conectados mediante la hélice E [Kunishima *et al.*, 1994].

2.3 Estructura de una hemo-peroxidasa de la Clase III

Las POXs (Clase III) son proteínas monoméricas de aproximadamente 300 residuos de aminoácidos [Dunford, 1999] que están, fundamentalmente, involucradas en la elongación celular, la construcción de la pared celular y su diferenciación, y en la defensa contra varios agentes patógenos. Esta clase de enzimas forma una numerosa familia multigénica en plantas superiores, y cuya expresión es particularmente sensible a varios eventos endógenos o exógenos. Además, en las angiospermas, los genes de POXs (aunque también en la Clase I) han sufrido varias duplicaciones en una fase evolutiva relativamente reciente. Ejemplificando este fenómeno, a la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se le han reportado 73 genes codificantes para isoenzimas de POXs [Valerio *et al.*, 2004], mientras que para *Zea mays* el número de isoenzimas de ésta clase llega a 151. El número total de genes de la Clase III depositados en el PeroxiBase (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>) hasta junio del 2012 es 5,077 lo cual representa el 50% de los miembros de la súper-familia [Zamocky & Obinger, 2010].

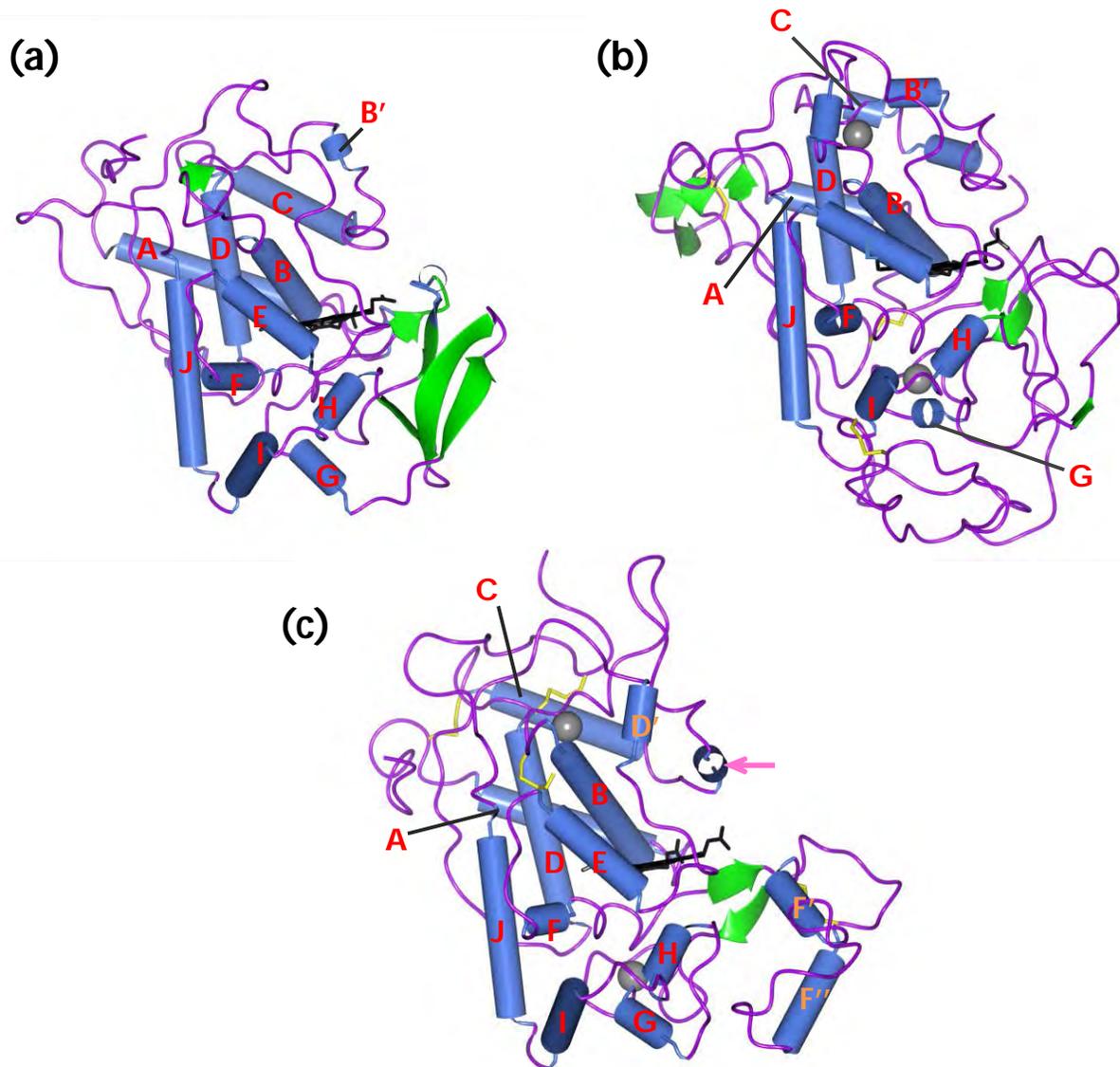


Figura 4. **Estructura tridimensional de representantes de las 3 clases de la super-familia de peroxidases-catalasas resaltando las α -hélices conservadas.** De la Clase I (a) CcP de levadura (código PDB 1ZBY); De la Clase II (b) LiP de *P. chrysosporium* (PDB 1LLP); De la Clase III (c) HRPC de *A. rusticana* (PDB 1ATJ). Se muestra la estructura secundaria (α -hélices en azul y hojas- β en verde) junto con el grupo hemo (negro), los puentes disulfuro (amarillo), y los iones de calcio (gris). Las etiquetas de las α -hélices únicas para la Clase III se muestran en naranja; La flecha rosa señala una hélice- 3_{10} que a veces se presenta en la Clase III, [Gajhede *et al.*, 1997] que correspondería a la hélice B' en las clases I y II.

Asimismo las enzimas de la Clase III son glicoproteínas que contienen dos iones calcio, cuatro puentes disulfuro conservados (ubicados en diferentes regiones a los puentes disulfuro de la Clase II), un puente salino basado invariablemente en un ácido aspártico y una arginina (Asp99 y Arg123 en la numeración de la HRP isoenzima C) y un péptido señal para secreción. Todos los miembros de la súper-familia presentan el mismo plegamiento helicoidal independientemente de la

presencia (Clase II y III) o ausencia (Clase I) de los puentes disulfuro y de los iones calcio estructurales [Ruiz-Dueñas & Martínez, 2010]. Para las POXs, tres regiones en la secuencia alrededor de las hélices B, D y F, son las más conservadas, mientras que las secuencias en el amino terminal, incluyendo la hélice A y los loops entre las hélices F y G son las menos conservadas [Welinder, 1992]; Las hélices adicionales F' y F'' se presentan en una relativamente larga inserción delimitada por las hélices F y G que muestra una variabilidad considerable en todas las POXs [Veitch, 2004]. Las comparaciones estructurales de las 3 clases se representan en la fig. 4, las cuales muestran a los modelos tridimensionales de peroxidasas representantes de la Clase I, CcP de levadura, de la Clase II, la LiP del basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*, y de la Clase III, la HRP isoenzima C (HRPC) de *Armoracia rusticana*.

2.4 El calcio en las hemo-peroxidasas de Clase II y III

Las peroxidasas de las Clases II y III se caracterizan por la presencia de dos iones calcio, altamente conservados, los cuales poseen un papel estructural [Welinder, 1992]. Uno de los sitios de unión a Ca^{2+} se encuentra en el dominio proximal, donde es probable que el ion se una fuertemente, debido a que su ubicación no es accesible al solvente. El segundo sitio de unión a Ca^{2+} se encuentra en el lado distal de la proteína, y el Ca^{2+} se une con menor fuerza, ya que se encuentra cerca de la superficie y está expuesto al solvente [Banci, 1997].

En hemo-peroxidasas ejemplares como HRP y LiP, ambos calcios están hepta-coordinados por oxígenos tanto de la cadena principal como de las cadenas laterales de residuos altamente conservados que pertenecen a las hélices que forman los sitios distal y proximal de la enzima, de hecho, cada ion Ca^{2+} forma un enlace de coordinación con el residuo que inmediatamente antecede a las histidinas proximal y distal. La depleción de los iones de Ca^{2+} en la HRPC resulta en la reorganización de los residuos del bolsillo del hemo, lo cual sugiere un papel estructural del Ca^{2+} en el mantenimiento del hemo de la HRPC en la geometría requerida para una catálisis eficiente [Laberge *et al.*, 2003], ya que esta remoción causa que cambien las propiedades redox del hierro, lo que consecuentemente perturba los potenciales de reducción de los Compuestos I y II [Banci, 1997].

2.5 Glicosilaciones en las hemo-peroxidasas

La glicosilación en proteínas es, por mucho, el más común y complejo tipo de modificación co- y post-traducciona presente en proteínas. La *N*-glicosilación (*Ngly*) es la forma de glicosilación más conservada en eucariontes. Se estima que alrededor del 70% de todas las proteínas en las bases de datos poseen sitios de *Ngly* (secuón Asn-X-Ser/Thr, siendo X cualquier a.a. menos Pro) potenciales [Lütteke *et al.*, 2003]. En plantas, la mayoría de las proteínas en el compartimento extracelular y del sistema endomembranoso están glicosiladas por *N*-oligosacáridos. La *Ngly* de las proteínas conlleva un impacto tanto en sus propiedades físico-químicas como en sus funciones biológicas, haciendo a las proteínas más solubles y reduciendo la flexibilidad de la cadena principal, conllevando esto a un incremento en la estabilidad de la estructura, protegiéndolas así de la proteólisis. Se ha observado también que los glicanos pueden tener un papel estructural, afectando el plegamiento terciario y cuaternario de las proteínas glicosiladas. [Wormald & Dwek, 1999].

Los *N*-glicanos de plantas se clasifican en tres grupos dependiendo de la madurez que alcance la cadena de azúcares durante su biosíntesis. Estos grupos son: A) *N*-glicanos de tipo alto en manosa; B) *N*-glicanos de tipo complejo; Y C) *N*-glicanos paucimanosídicos, también llamados truncados [Rayon *et al.*, 1998]. La estructura de cada grupo puede observarse en la fig. 5.

Las POXs se encuentran altamente glicosiladas; Los *N*-glicanos enlazados a éstas llegan a representar hasta el 30% de la masa total de la proteína; Como ejemplo está la HRPC, la cual posee 8 sitios de glicosilación que presentan el secuón Asn-X-Ser/Thr (X no es Pro) que ocurren en regiones de *loops* hacia el exterior de la enzima [Passardi *et al.*, 2005].

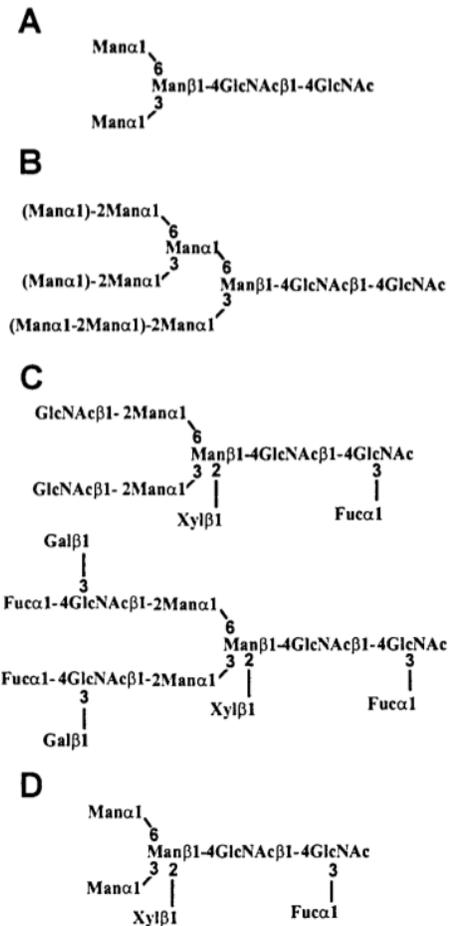
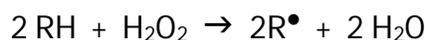


Figura 5. Estructura de los *N*-glicanos de plantas. (A) Cadena principal común de los *N*-glicanos; (B) *N*-glicanos de tipo alto en manosa; (C) *N*-glicanos de tipo complejo; Y (D) *N*-glicanos de tipo paucimanosídico. (Tomado de Rayon *et al.*, 1998).

2.6 Mecanismos catalíticos de las hemo-peroxidasas

Las hemo-peroxidasas son proteínas ubicuas que catalizan la oxidación de un electrón de sus sustratos empleando un peróxido, generalmente H_2O_2 , como su co-sustrato. La reacción general puede escribirse de la siguiente forma:



Donde RH es un sustrato adecuado para la peroxidasas y R^\bullet es un producto radical libre derivado del sustrato. Todas las peroxidasas estudiadas hasta el momento comparten un ciclo catalítico similar (Hiner *et al.*, 2002). El ciclo catalítico genérico de las peroxidasas puede visualizarse en la fig. 6, aunque esta red de transformaciones involucra mecanismos más complejos de los que se representan y pueden darse casos particulares [Ortiz de Montellano, 2010].

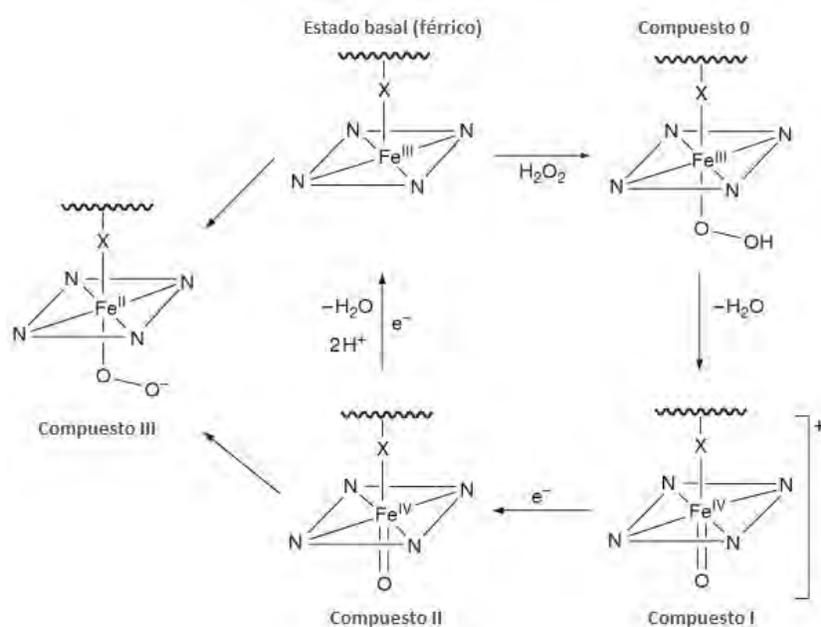


Figura 6. **Ciclo catalítico genérico de las peroxidasas.** La 'X' representa la His proximal. (Modificado de Ortiz de Montellano, 2010).

2.6.1 Estado férrico

El grupo hemo prostético de una PRX en estado basal se encuentra en el estado férrico. En la mayoría de las peroxidasas, incluyendo a las POXs, el hierro está penta-coordinado con un alto spin,

teniendo a una histidina como ligando proximal del hierro y a una molécula de agua en su lado distal que no está coordinada con el hierro. Adicionalmente al ligando de His proximal, casi todas las PRXs poseen una histidina y arginina distales no enlazadas al hemo que están involucradas directamente en la catálisis (ver fig. 2) [Ortiz de Montellano, 2010].

2.6.2 Compuesto O y Compuesto I (radical porfirina)

El primer paso en la reacción catalítica de una PRX involucra la unión de peróxido (usualmente H_2O_2) al hierro del hemo para producir un intermediario hidropéroxido férrico ($Fe^{3+}OOH$) llamado Compuesto O [Baek & Van Wart, 1989]. Se piensa que el residuo de His distal en el sitio activo de las PRXs es la base que desprotona el peróxido en la formación del Compuesto O.

El siguiente paso en el ciclo catalítico es la conversión del Compuesto O al Compuesto I (ver la esquematización en la fig. 7), lo cual requiere la protonación del oxígeno distal del complejo hidropéroxido férrico para que se elimine formándose una molécula de agua. Para que lo anterior tenga lugar, el peróxido desprotonado es llevado por el imidazol del residuo de His al oxígeno terminal del complejo hidropéroxido férrico, catalizando la ruptura del enlace O-O que produce el Compuesto I. La secuencia general de esta reacción es conocida como el mecanismo Poulos-Kraut [Poulos & Kraut, 1980] postulado así después de que la estructura tridimensional de la CcP fue obtenida.

La His y la Arg distales poseen un papel primordial en la formación y estabilización del Compuestos I. El H_2O_2 entrante transfiere un protón a la His distal, la cual está desprotonada cuando la enzima está activa. La estabilización de la forma desprotonada, la cual puede aceptar un protón del H_2O_2 , está determinada por un puente de H entre la His N_{E2} y un oxígeno en la cadena lateral de la Asn84 (numeración según LiP), la cual también se une por un puente de H a la Glu78. Estos últimos dos residuos son invariables o altamente conservados, respectivamente. La Arg distal facilita la ruptura heterolítica del enlace dióxigeno del peróxido mediante interacciones polares [Banci, 1996]. El papel de la His y Arg distales se probó mediante estudios de mutagénesis donde se observó que la pérdida de uno de estos residuos o de ambos disminuía la actividad catalítica de la HRP [Newmyer & Ortiz de Montellano, 1995] y la CcP, encontrándose a la His distal como la más importante para mantener el mecanismo.

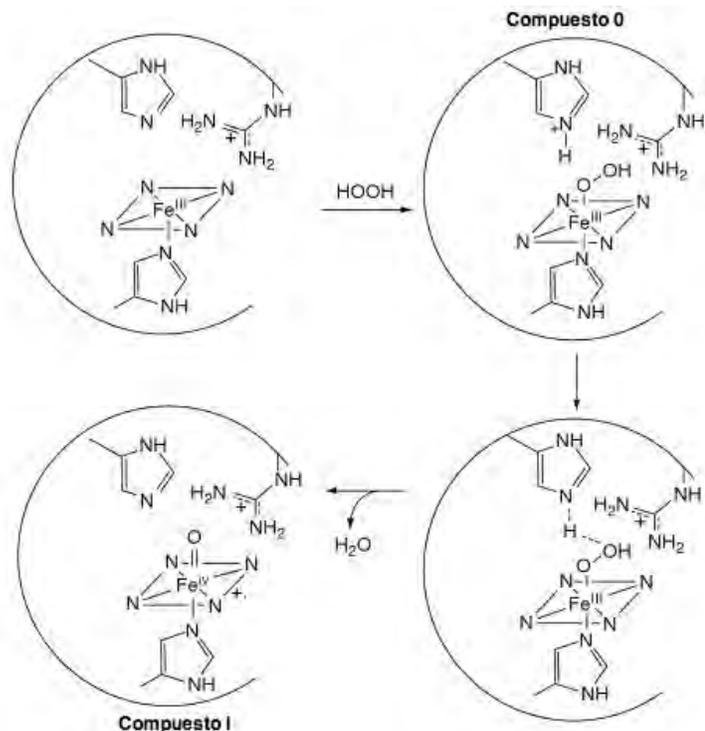


Figura 7. Representación esquemática de la formación del Compuesto 0 y subsecuente Compuesto I. La formación del Compuesto I (mecanismo Poulos-Kraut) involucra a la histidina distal conservada que sirve como un catalizador ácido-base y que transfiere un protón del H₂O₂ al oxígeno terminal después de la formación del Compuesto 0. Se muestran el ligando hierro-histidina proximal y los residuos de histidina y arginina distales catalíticos. (Modificado de Newmyer & Ortiz de Montellano, 1995).

2.6.3 Compuesto II

Siguiendo la reacción catalítica, la reducción de un electrón del Compuesto I produce el Compuesto II, en donde el hierro sigue presente en la forma (Fe⁴⁺), pero el radical porfirina está apantallado [Ortiz de Montellano, 2010]. Para completar el ciclo catalítico, el Compuesto II es reducido nuevamente al estado férrico por una subsecuente transferencia de un electrón de un sustrato reductor, generándose así otra molécula de H₂O. La principal diferencia entre los Compuestos I y II son sus estados del hemo. El Compuesto I posee un grupo hemo porfirina catión radical, y su reducción requiere sólo la transferencia de un electrón de la esfera exterior del sustrato al hemo, mientras que el Compuesto II posee un hemo oxo-ferril neutral no-radical de bajo spin, y las reacciones del Compuesto II requieren un cambio en el estado del hemo a un estado férrico de alto spin. En el ciclo catalítico, la reducción del Compuesto II usualmente es el paso limitante [Schoemaker et al., 1994].

2.7 Mecanismo de inactivación de una peroxidasa

Aún cuando las PRXs representan una fuente prometedora para uso industrial, su uso comercial se ha visto condicionado, principalmente por su baja estabilidad oxidativa a su propio co-sustrato natural, el peróxido de hidrógeno; Todas las hemo-proteínas, incluyendo las PRXs, se inactivan en presencia de concentraciones catalíticas de H_2O_2 .

Este fenómeno común ocurre cuando se presenta un exceso de H_2O_2 , lo que causa la formación del llamado Compuesto III, un intermediario inactivo dioxi-ferroso. El Compuesto III se forma por la reacción del Compuesto II con H_2O_2 . Adicionalmente, otros mecanismos para la formación del Compuesto III se han observado: (a) Mediante la reacción de la enzima ferrosa con O_2 , y (b) mediante la reacción de la enzima férrica con un anión superóxido. Además, en la presencia de altas concentraciones de H_2O_2 , el Compuesto III puede presentar reacciones adicionales que llevan a la inactivación irreversible de la enzima. Empero, el mecanismo de esta inactivación irreversible por H_2O_2 no está completamente esclarecido [Valderrama *et al.*, 2002].

No obstante, la presencia de un sustrato reductor eficiente puede retardar esta reacción irreversible de las PRXs. Es más, se ha sugerido que algunos radicales tales como el radical fenoxil puede reaccionar con el Compuesto III para regresar a este intermediario a su forma de enzima activa [Barr & Aust, 1994]. Típicos ejemplos de sustratos reductores en el caso de las POXs son aminas aromáticas, índoles, ácidos fenólicos, fenoles y azoderivados [Veitch, 2004].

Todas las POXs hasta ahora estudiadas son susceptibles a la inactivación por H_2O_2 en presencia de sustratos reductores, sin embargo, el nivel de susceptibilidad varía mucho de enzima a enzima [Hiner *et al.*, 2002]. Es aquí donde destaca una isoenzima de POXs recientemente aislada [Gil-Rodríguez *et al.*, 2008], que es naturalmente resistente a la inactivación por H_2O_2 , llamada **Zo-Peroxidasa** (ZoPrx), y que junto a recientes estudios que indican que este fenómeno común de inactivación en PRXs es susceptible a ser manipulado, han llevado a pensar que en un futuro será posible diseñar variantes resistentes al H_2O_2 [Valderrama, 2010].

2.8 La Zo-Peroxidasa, una enzima intrínsecamente resistente a la inactivación por H_2O_2

En la búsqueda por hemo-peroxidases más estables al daño oxidativo, Gil-Rodríguez *et al.* [2008] eligieron como blanco al rábano japonés (*Raphanus sativus* L. var. *longipinnatus*, nombre

común Daikon) debido a que sus raíces poseen al menos 18 diferentes isoenzimas de PRX con diferentes propiedades [Morita *et al.*, 1971]. En su trabajo, Gil-Rodríguez y col. lograron identificar, aislar sistemáticamente y caracterizar bioquímicamente una rara isoforma siendo la primera isoenzima de PRX con ocurrencia natural mucho más estable a la inactivación oxidativa, bautizada Zo-Peroxidasa ($\zeta\omega$, del gr. “permanente”).

La secuenciación parcial de la ZoPrx –un total de 104 residuos de a.a. cuatro fragmentos– (ver fig. 10, secciones en color) demostró una relación mayor con las isoenzimas aniónicas 2 de *A. thaliana* (ATP A2) y *Armoracia rusticana* (HRP A2) que con cualquier otra isoenzima.

En el mismo trabajo se encontró que la ZoPrx es una especie monomérica con una masa aproximada de 47 kDa, que presenta su punto isoeléctrico a un pH 4 (aunque presenta una mayor estabilidad a pH 6.1), y cuya muestra concentrada presenta un intenso color rojizo debido a un característico pico de absorbancia de 403 nm, lo cual corroboró a esta enzima como una hemo-proteína [Gil-Rodríguez *et al.*, 2008].

La estabilidad oxidativa de la ZoPrx se probó mediante exhaustivos evaluaciones de resistencia contra H_2O_2 en presencia o ausencia de sustratos reductores exógenos que eran consistentes para la integridad de la porfirina, resultando en la superioridad de la ZoPrx sobre la HRP A2 en rangos de estabilidad oxidativa (con una vida media >160 min en presencia de 10 mM de H_2O_2 ; Gil-Rodríguez & Valderrama, 2009). Previamente, esta última isoenzima había sido considerada la POX más estable a la inactivación oxidativa. Además, se corroboró que la ZoPrx conserva el mecanismo catalítico clásico común de todas las PRXs, con la formación de los intermediarios Compuestos I y II, aunque sus constantes cinéticas en el ciclo catalítico difirieren significativamente de los de la HRP A2. También se sugirió que la estabilidad de la ZoPrx no se debe a la protección que le confiere su actividad de catalasa (ver Gil-Rodríguez, 2006), ya que para la HRP A2, en un ambiente más básico, tanto su actividad de catalasa como su resistencia a inactivarse aumenta, mientras que para la ZoPrx a un pH de 6.1 -donde se observa su mayor estabilidad- su actividad de catalasa es mucho menor a la de HRP A2 al mismo pH.

La característica distintiva de la ZoPrx es que cuando se forma el Compuesto III en presencia de H_2O_2 en exceso, este intermediario es específicamente más estable al daño oxidativo ($t_{1/2}$ de la actividad mayor a 120 min en presencia de 10 mM H_2O_2), y en vez de comprometerse en las rutas de inactivación usuales, toma la ruta de restauración hacia el estado basal, por lo que la ZoPrx, hasta el momento, es la única hemo-peroxidasa natural que presenta estabilidad oxidativa significativa debido a propiedades intrínsecas. Ya que el mecanismo de inactivación está ligado al mecanismo catalítico, se descartó que la estabilidad oxidativa de la ZoPrx se debiera a una baja eficiencia en su

ciclo catalítico mediante la comparación de los parámetros catalíticos de la ZoPrx con los de la HRP A2, lo cual resultó en una eficiencia catalítica muy similar para ambas enzimas. Pese a esto último, se observaron diferencias en la cinética de su ciclo catalítico; Mientras que para la HRP A2 el paso limitante en la reacción es la formación del Compuesto I, el paso limitante para la ZoPrx es el regreso al estado basal. Esta diferencia puede ser causada por diversas razones: 1) Que los potenciales redox de los Compuesto I y II de la ZoPrx sean menores a los de la HRP A2; 2) Que la ZoPrx presente características estructurales que no le permitan al sustrato alcanzar rápidamente al hemo; Y/o 3) Que se hallen diferencias en la configuración de los ligandos que interaccionan con el sustrato para que se oxide [Gil-Rodríguez, 2006]. De estas tres posibles razones para que la ZoPrx sea altamente estable en presencia de una alta concentración de H₂O₂, en el presente trabajo se tratarán de probar o descartar las últimas dos, a través la determinación de la estructura tridimensional de la ZoPrx mediante el uso de la cristalografía de Rayos X.

2.9 Cristalografía de Rayos-X de peroxidasas

La cristalografía de Rayos-X es, hasta el momento, la técnica más exitosa para la obtención de estructuras tridimensionales de moléculas relativamente grandes, como las proteínas.

El progreso inicial en la cristalografía de peroxidasas llegó con la caracterización de la CcP de levadura por Yonetani y cols. [1976]. Características como el ser más sencilla que la HRP (no posee azúcares, puentes disulfuro y sólo contiene un ion metálico, el hierro en su grupo hemo) y su relativa facilidad de cristalizar por diálisis contra agua, permitieron la obtención de la primera estructura de una hemo-peroxidasa por difracción de Rayos-X ya hace más de 30 años [Poulos *et al.*, 1980]. La CcP fue la primera hemo-peroxidasa que permitió la comprobación de relaciones estructura-función mediante el uso de la cristalografía y la ingeniería de proteínas [Poulos, 2010].

En la actualidad (hasta junio del 2012) se encuentran 278 estructuras tridimensionales de PRXs disponibles en el *Protein Data Bank* (PDB; <http://www.pdb.org>), las cuáles dan lugar a casi 600 depósitos en la misma base de datos., de las más de 10 mil secuencias de peroxidasas incluidas en el *PeroxiBase* [Ruiz-Dueñas & Martínez, 2010]. De estas 278 hemo-peroxidasas determinadas estructuralmente, solo existen hasta el momento siete estructuras cristalográficas de POXs que corresponden al grupo de plegamiento denominado 'peroxidasas de plantas' (denominadas en conjunto para este trabajo como 7PXs), las cuales se enlistan en la tabla 1. Este relativamente bajo número de estructuras obtenidas puede deberse, una vez que se han logrado purificar, a que el alto

contenido de azúcares en algunas POXs, las hace relativamente difíciles de cristalizar. Pero para contrarrestar este problema, como se indica en la tabla 1, la mayoría de las estructuras determinadas por métodos de Rayos-X, provinieron de fuentes de ADN recombinante, que producen enzimas activas pero no glicosiladas.

Una cuestión que siempre se debe tomar en cuenta cuando se realiza cristalografía de Rayos-X, es que este tipo radiación ionizante (junto con la radiación gamma) genera radicales libres cuando interactúa con diversos átomos presentes en la matriz cristalina. Por lo tanto, es importante tener presente que los Rayos-X empleados para la determinación de estructuras tridimensionales pueden dañar y/o modificar a las moléculas de proteínas. El daño por radiación es una consecuencia inherente e inevitable de la cristalografía de Rayos-X, debida a la interacción que existe entre la radiación ionizante de los Rayos-X y los cristales [Weik *et al.*, 2000]. Los daños en las moléculas de proteína son tanto inespecíficos como específicos, y se han observado tanto a temperatura ambiente como a temperaturas criogénicas (≤ 100 K), las cuales solo lo disminuyen comprometiendo la difusión de las especies radiolíticas. Los daños inespecíficos, cuando se presentan, causan que los valores *B* y el mosaicismo se incrementen, que el volumen de la celda unitaria se expanda y que las moléculas sufran pequeñas rotaciones y traslaciones, lo que causa la degradación gradual del orden cristalino, y por lo tanto, de la capacidad de difractar a los Rayos-X. Los daños específicos involucran la reducción gradual de los sitios metálicos contenidos en algunas proteínas, además causan que se rompan algunas uniones covalentes, con el subsecuente desordenamiento de los átomos involucrados [Petrova *et al.*, 2010].

Tabla 1. **Peroxidasas de la Clase III con plegamiento de PRXs de plantas**, con estructura tridimensional determinada por cristalografía de Rayos-X disponible en el PDB. El hemo en todas estas estructuras se encuentra en estado basal.

Nombre común (especie)	Isoenzima de PRX	Fuente	Resolución (Å)	Código PDB	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ATP A2	recombinante	1.45	1PA2	Østergaard <i>et al.</i> , 2000
	ATP N	recombinante	1.90	1QGJ	Mirza & Welinder, 2000
Frijol de soya (<i>Glycine max</i>)	SBP	recombinante	2.80	1FHF	Henriksen <i>et al.</i> , 2001
Rábano picante (<i>Armoracia rusticana</i>)	HRPC	recombinante	2.15	1ATJ	Gajhede <i>et al.</i> , 1997
Cacahuatate (<i>Arachis hypogaea</i>)	PNP	cultivo celular	2.70	1SCH	Schuller <i>et al.</i> , 1996
Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	BP 1	grano	1.90	1BGP	Henriksen <i>et al.</i> , 1998
Palmera real (<i>Reystonea regia</i>)	RPTP	hoja	1.85	3HDL	Watababe <i>et al.</i> , 2010

3. *HIPÓTESIS*

Con base a la secuencia parcial que se tiene de la Zo-Peroxidasa, se espera que ésta presente un plegamiento similar al de las peroxidases de la Clase III de la súper-familia de peroxidases-catalasas.

El estudio cristalográfico del modelo que se obtenga de la Zo-Peroxidasa podría evidenciar a los determinantes estructurales que le confieren una mayor estabilidad oxidativa frente al peróxido de hidrógeno.

4. *OBJETIVO*

Determinar la estructura tridimensional de la Zo-Peroxidasa mediante la técnica de cristalografía de Rayos X.

4.1 *Objetivos particulares*

- Completar la secuencia de residuos de aminoácidos de la proteína mediante el ajuste del modelo sobre el mapa de densidad electrónica.
- Hacer una comparación secuencia/estructura de la ZoPrx con sus homólogos.
- De acuerdo a las similitudes/diferencias encontradas, proponer un motivo estructural al que pudiera atribuirse su mayor resistencia ante el peróxido de hidrógeno.

5. METODOLOGÍA

5.1 Purificación y Cristalización

Se empleó proteína previamente purificada de rábanos japoneses frescos y almacenada en el laboratorio donde se realizó el presente trabajo. Su purificación se realizó mediante el método descrito por Gil-Rodríguez & Valderrama [2009], que incluye la ultrafiltración (corte molecular de 100 y 10 kDa) del extracto crudo de rábanos japoneses frescos, que luego se dializa con *buffer* de acetato de sodio (BAS) 20 mM a pH 4.5 a 4 °C, se centrifuga, y se aplica a una columna de intercambio catiónico débil Macro-Prep CM (Bio-Rad) equilibrada en el mismo BAS. La fracción que no interactúa con la matriz se dializa a 4 °C contra 20 volúmenes de *buffer* de fosfato de sodio (BFS) 10 mM a pH 6.1 y se equilibra con sulfato de amonio a una concentración de 2.5 M a temperatura ambiente. Esta preparación se aplica a una columna de interacción hidrofóbica Macro-Prep t-Butyl HIC (Bio-Rad) equilibrada en el mismo *buffer*. Se eluye con un gradiente de 2.5 a 1 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el mismo *buffer*, y se prueba la estabilidad de las fracciones colectadas al incubarlas con H_2O_2 , escogiéndose aquellas que presenten una recuperación mínima del 70% de su actividad. Estas fracciones se dializan contra 50 volúmenes de BFS 10 mM a 4 °C y se concentran por ultrafiltración (corte molecular de 1 kDa). Esto se aplica a una columna de exclusión molecular conteniendo Hi-Load 26/60 Superdex 200 equilibrada en BFS 100 mM a pH 6.1, y se eluye a un flujo de 2.5 mL/min. La fracción con al menos 90% de la actividad inicial después de su incubación con 1 mM H_2O_2 , que contiene la ZoPrx pura, se dializa contra 100 mM BFS y se preserva a 4 °C.

Para probar la actividad de peroxidasa, las fracciones colectadas durante la purificación fueron expuestas a 1 mM de H_2O_2 usando como sustrato reductor 16 mM de guaicol ($\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en 1 mL de BFS 60 mM a pH 6.1. Para seleccionar las fracciones con mayor estabilidad al H_2O_2 , se incubaron con 10 mM de H_2O_2 por dos horas y detectándose la actividad residual de las fracciones usando el mismo sustrato reductor en el mismo *buffer* a las mismas concentraciones.

La fracción con ZoPrx pura previamente purificada se preservó a 4 °C, y ya que se probó que se mantiene completamente activa al menos por un año [Gil-Rodríguez & Valderrama, 2009], no se vio ningún problema para utilizar la muestra guardada en las pruebas de cristalización realizadas en este trabajo.

Antes de realizar las pruebas de cristalización, la muestra de ZoPrx se concentró a 50 mg mL⁻¹. Se seleccionaron los kits *Crystal Screen I* y *II* de Hampton Research (Laguna Niguel, California,

E.U.) como puntos de partida en la búsqueda de las condiciones idóneas de cristalización; Las pruebas de cristalización se realizaron con el método de difusión en fase vapor bajo la modalidad de gota sedente, mezclando 0.2 μL de proteína en una solución amortiguadora de 0.1 mM BFS más 0.2 μL de solución precipitante expuestas a 4 y 18 °C. Se obtuvieron microcristales de la ZoPrx después de 4 meses en la condición de cristalización No. 22 del *Crystal Screen II*, la cual está compuesta de 0.1 M ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (MES) pH 6.5 y 12% (v/v) Polietilenglicol (PEG) 6000 a 18 °C. Para optimizar el tiempo de cristalización se diseñó una matriz variando el porcentaje de PEG: 15, 17, 19 y 20 % (v/v) y la concentración de proteína: 20, 40 y 50 mg mL⁻¹, agregándose también 10 mM acetato de zinc (C₄H₁₀O₆Zn) como aditivo, y se incluyó la modalidad de gota colgante. Después de este proceso de optimización, el tiempo de cristalización se redujo a 1 mes y medio y se obtuvieron cristales bajo la modalidad de gota colgante y gota sedente, en solución del reservorio de 0.1 M MES pH 6.5 y 20% PEG 6000 en gota colgante (condición que se llamó B3), y 0.1 M MES pH 6.5 tanto en 15 como 19 % PEG 6000 más 10 mM C₄H₁₀O₆Zn en gota sedente (condiciones que se etiquetaron como D4 y D5, respectivamente). En estas 3 condiciones que produjeron cristales, la proteína se encontraba en una concentración de 50 mg mL⁻¹. El volumen dentro del reservorio en ambas modalidades (gota colgante y gota sedente) fue de 1 mL. A partir del proceso de optimización, todas las gotas tenían un volumen final de 4 μL , con proporciones iguales de solución de proteína y solución del reservorio (2 + 2 μL). Las condiciones de cristalización se realizaron a 18 °C y se utilizó agua tetradestilada en todos los casos.

5.2 Colecta de datos de Rayos-X

Los datos de difracción de la ZoPrx (en las 3 condiciones de cristalización) se colectaron en la línea X6A del *National Synchrotron Light Source* (NSLS), *Brookhaven National Laboratory* (BNL), Upton, Nueva York, EE.UU., utilizando un detector ADSC Quantum 270. Se colectó un *data set* por cada cristal (3 en total, uno de cada condición), todas a 100 K (-173 °C) y se utilizó como crioprotector PEG 200. Se usaron Rayos-X de una longitud de onda de 1.7329 Å. Aunque se difractó un cristal de cada condición de cristalización (B3, D4 y D5), sólo el cristal de la condición B3 arrojó datos integrables. Se anexa una fotografía tomada en la misma línea del cristal de la condición B3, fig. 8. La distancia cristal-detector se mantuvo en 180 mm con un intervalo de oscilación ($\Delta\varphi$) por imagen de 1.0°.

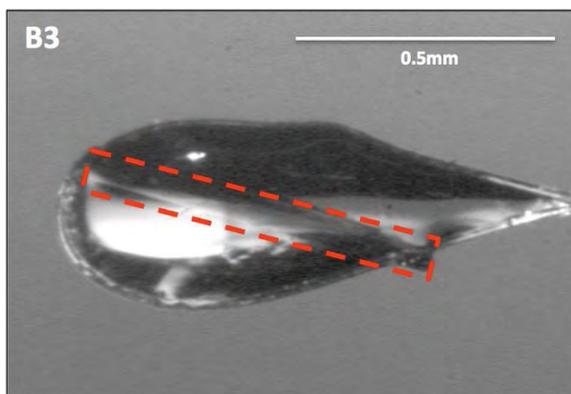


Figura 8. **Fotografía del cristal de la condición B3**, acomodado en un haza de 0.7mm. Se resalta la periferia del cristal en una línea punteada roja. Tomada en la línea X6A del NSLS.

5.3 Procesamiento de datos y afinamiento del modelo

La determinación del grupo espacial, parámetros de celda unidad y la integración de los datos se realizó con el programa *Denzo*. El ordenamiento y escalamiento de los datos se realizó en *Scalepack*. Ambos programas se encuentran en la *suite HKL-2000* [Otwinowski & Minor, 1997]. Se realizó un reemplazo molecular en *MOLREP* [Vagin & Teplyakov, 1997], utilizando como modelo de búsqueda las coordenadas de la ATP A2 (código PDB 1PA2) debido a que ésta enzima tiene una identidad de 87.7% considerando a los 104 residuos previamente secuenciados de la ZoPrx. Cabe resaltar que la longitud de onda de colecta, 1.73 Å, se debió a que en una primera etapa se consideró utilizar a la señal anómala del hierro para calcular fases, sin embargo ésta señal no fue suficiente. El modelo resultante fue sujeto a afinamiento de cuerpo rígido seguido de afinamiento restringido, ambos en el programa *REFMAC* [Murshudov *et al.*, 1997]. La secuencia de la ZoPrx fue determinada y confirmada mediante la evaluación del ajuste del modelo al mapa de densidad electrónica $2F_o - F_c$ a una resolución de 2.05 Å en el programa *Coot* [Emsley *et al.*, 2010], donde se llevaron a cabo el ajuste y construcción manual del modelo tridimensional y la adición de los iones de calcio, los glicanos y las moléculas de agua. Los sitios de *N*-glicosilación fueron previamente monitoreados usando la aplicación *GlyProt* [Bohne-Lang, A. & von der Lieth, 2005]. Los ciclos de afinamiento (o iteraciones) se concluyeron cuando se obtuvieron los valores de R_{work} y R_{free} más bajos, siendo estos de 0.16 y 0.18 respectivamente.

5.4 Comparación secuencia-estructura con enzimas homólogas

Al obtenerse las coordenadas del modelo estructural tridimensional final de la ZoPrx, el primer aporte de este trabajo consistió en la obtención de la secuencia completa de la misma peroxidasa basada en la densidad electrónica y en un consenso de las secuencias de proteínas que fueran homólogas a nuestra hemo-peroxidasa. Con la secuencia preliminar que se tenía de la ZoPrx basada en la ATP A2, se realizó una búsqueda de regiones de similitud entre secuencias depositadas en dos bases de datos diferentes para encontrar enzimas que fuesen homólogas a la ZoPrx mediante el programa NCBI-*BLAST* (*Basic Local Alignment Tools*) [Madden, 2003] del *European Bioinformatics Institute* (EBI; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/>); Primero se usó el PDB para encontrar homólogos que ya estuviesen determinados estructuralmente, y después se empleó la UniProt (*Universal Protein Resource*; <http://www.uniprot.org>) del EBI para hallar secuencias de proteínas que contaran con al menos 50% de identidad con la secuencia preliminar de la ZoPrx. De la búsqueda en el PDB se encontró que todas las enzimas (siendo todas hemo-peroxidasas) con un porcentaje de identidad mayor al 40% (siete enzimas, llamadas en conjunto como 7PXs, ver tabla 1) presentan el mismo tipo de plegamiento que la ZoPrx. Y de la búsqueda en el UniProt, se rescataron las primeras 50 secuencias (también hemo-peroxidasas), que compartían una identidad del 87% hasta 58.3%. Al mismo tiempo se efectuó un alineamiento múltiple de secuencias (MSA, por sus siglas en inglés) mediante el empleo de la herramienta *MView* del EBI [Brown *et al.*, 1998] de la ZoPrx y de las 7PXs más las 50 hemo-peroxidasas del UniProt, para completar y evaluar la secuencia modelada sobre las coordenadas del mapa de densidad electrónica. Una vez corroborada la secuencia final, se comparó nuevamente con las secuencias de las siete enzimas homólogas del PDB para resaltar las regiones de la secuencia con mayor o menor identidad.

Para encontrar similitudes y diferencias estructurales entre la ZoPrx y sus enzimas homólogas, se obtuvieron los archivos de coordenadas de las 7PXs y se realizó un alineamiento estructural en *Coot* y en el programa gráfico *CCP4mg* [McNicholas *et al.*, 2011], que permitieron el análisis visual de las estructuras de las ocho enzimas superpuestas.

6. RESULTADOS

Todas las representaciones gráficas de cada molécula o sus partes en el presente trabajo fue realizada en el programa *CCP4mg*, a menos que se indique lo contrario.

6.1 Modelo cristalográfico y secuencia de la Zo-Peroxidasa

Después de 121 procesos de iteración empleando los programas *REFMAC* y *Coot* (la estadística de colecta de datos y de afinamiento se resumen en la tabla 2), se logró obtener el modelo estructural tridimensional final de la Zo-Peroxidasa (ilustrado en la fig. 9), determinándose también durante el proceso la secuencia de residuos de a.a. de esta peroxidasa. La estructura cristalográfica de la ZoPrx del rábano japonés *Raphanus sativus* L. Daikon se determinó a 2.05 Å de resolución a 100 K, afinándose con un valor-R (R_{work}) de 16.3% y un valor R_{free} de 18.5%. El cristal difractado perteneció al grupo espacial $P12_11$ con parámetros de celda unidad de $a = 56.1$ Å, $b = 41.2$ Å, $c = 137.8$ Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 96.91^\circ$, $\gamma = 90^\circ$. Se obtuvieron un total de 51917 reflexiones únicas con un R_{sym} global de 50% e integridad de 99.2 %. El cálculo del coeficiente de Matthews demostró la presencia de dos monómeros en la unidad asimétrica ($V_m = 2.49$ Å³ Da⁻¹, con un contenido de solvente del 50.59%), por lo que después del reemplazo molecular, ambas copias de la ZoPrx contenidas en la unidad asimétrica fueron modeladas manualmente en *Coot*. A partir de aquí dichos monómeros serán denominados molécula A (ver fig. 9) y molécula B. Estas moléculas, al ser parte de la unidad asimétrica, resultaron no ser completamente idénticas, y sus respectivas diferencias serán discutidas más adelante.

La gráfica de Ramachandran muestra que el 98.46% de los residuos residen en las regiones más favorecidas, que el 1.37% de los residuos residen en regiones permitidas, y que el 0.17% equivalente a un solo residuo, recae en una región fuera del intervalo permitido de la gráfica. Este residuo es la Arg215 de la molécula B, ubicado entre las hélices F'' y G, se encuentra en una región donde la densidad electrónica es muy escasa, por lo que su modelaje se basó puramente en referencia a la densidad electrónica de la misma región para la molécula A.

Las cadenas laterales de los residuos Gln26, Cys93, Cys99, Cys178, Ser253 y Cys301 presentan dos conformaciones alternas en la molécula A, mientras que los residuos Cys93, Cys178, Thr236 y Ser253 presentan dos conformaciones alternas en la molécula B. Las ocupaciones relativas de estas dobles conformaciones se afinaron mientras se restringía la ocupación total de los

Tabla 2. **Datos cristalográficos de la ZoPrx**, incluye la estadística de la colecta de datos y la estadística del afinamiento de la estructura.

Estadística de colecta de Datos	
Grupo Espacial	P 1 2₁ 1
Parámetros de Celda (a, b, c / Å ; α , β , γ / °)	59.15, 41.19, 137.80; 90, 96.91, 90
Residuos por monómero / monómeros por unidad asimétrica (UA).	307 / 2
Mosaicismo (°)	0.3
Coeficiente de Matthews (Å ³ /Da) / Contenido de Solvente (%)	2.49 / 50.59
Fuente de rayos X	Línea X6a del NSLS
Detector	CCD ADSC
Longitud de onda (Å)	1.7329
Intervalo de resolución	30.0 -2.05 (2.09 -2.05)
Reflexiones únicas	51917
Redundancia	6.1 (6.4)
Integridad (%)	98.6 (99.2)
I/ σ (I)	21.6 (3.5)
R _{sym} (%)	8 (50)
Valor B de la gráfica de Wilson (Å ²)	27.82
Estadística de Afinamiento	
R _{work} / R _{free} (%)	16.3 / 18.5
Residuos de Proteína / Azúcares / Moléculas de aguas / Fragmentos de PEG / Iones Ca *por UA	614 / 48 (24 NAG, 10 FUC, 11 MAN y 3 XYS) / 700 / 8 / 4
RMSD de enlaces (Å)	0.03
RMSD de ángulos (°)	1.64
Valor B promedio del contenido de la UA	29.53
Gráfica de Ramachandran: Favorecidas / Permitidas / Fuera de Intervalo (%)	98.46 / 1.37 / 0.17
Código PDB	4A5G
Número de imágenes colectadas ($\Delta\phi = 1^\circ$)	360
Error estimado en las coordenadas [basado en máxima verosimilitud, MLB] (Å)	0.56

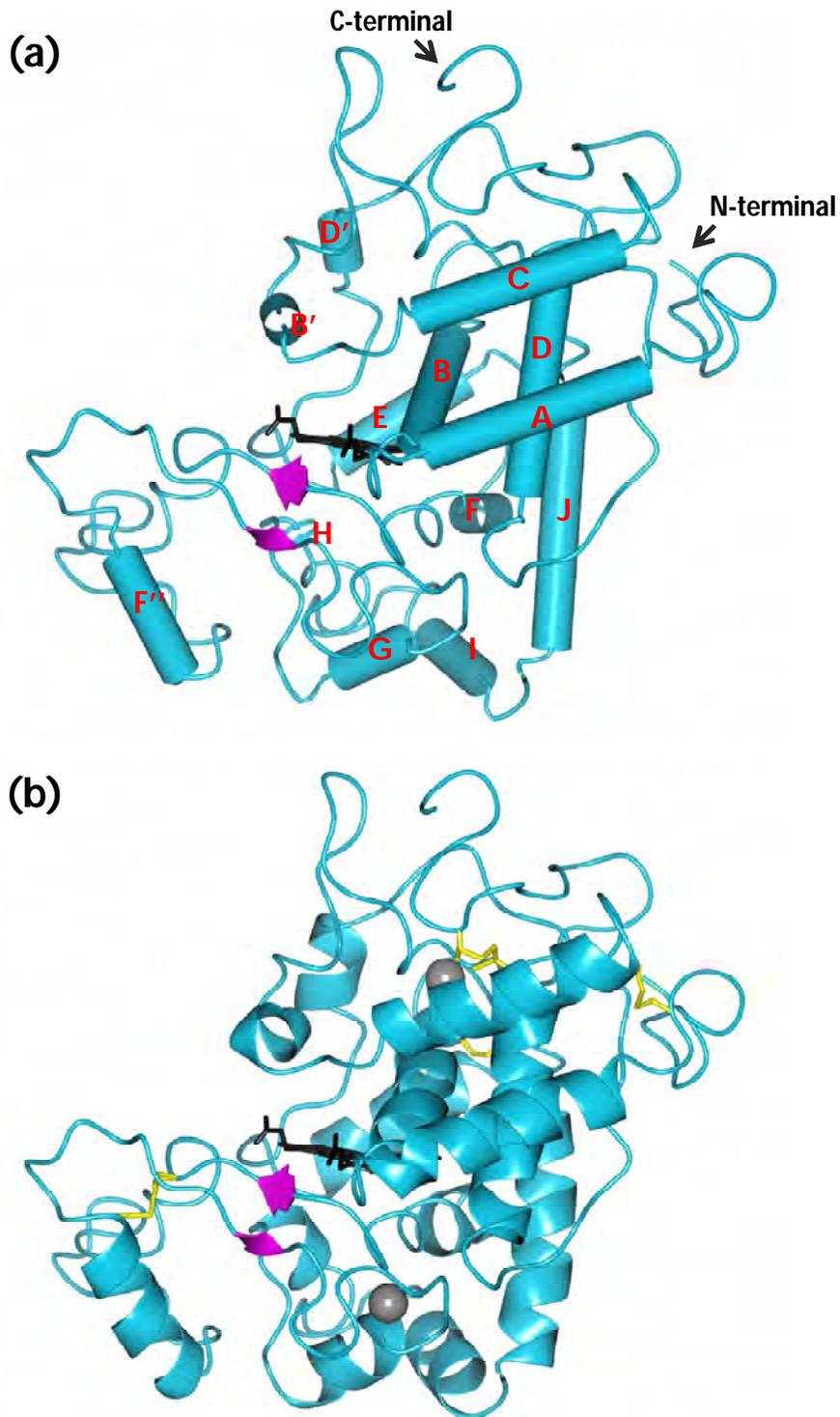


Figura 9. **Modelo cristalográfico final de la ZoPxx.** (a) Representación de Richardson donde se indican los elementos de la estructura secundaria. La hélice H es muy pequeña –apenas visible en el modelo–, detrás de las dos hojas- β [azules], y la hélice F' está totalmente ausente. (b) Representación de listón; Se observan el grupo hemo b (negro) que conforma el sitio catalítico, los 4 puentes disulfuro (amarillo), y los 2 iones calcio (gris) que contienen todas las POX. Estas representaciones gráficas corresponden a la molécula A, orientada de forma que el hemo marca horizontalmente la división entre el dominio I (arriba) y el dominio II (abajo) de la enzima.

átomos implicados en una conformación alterna a 1. Se incluyeron un total de 700 moléculas de agua distribuidas entre ambos monómeros modelados, 364 moléculas de agua en la molécula A y 336 en la molécula B.

Como se predijo en el trabajo de Gil-Rodríguez *et al.* [2008], la ZoPrx resultó ser una oxido-reductasa monomérica ácida de la Clase III de la súper-familia de peroxidasas-catalasas; La ZoPrx presenta un plegamiento típico de las peroxidasas de plantas [Holm & Sander, 1996], y que al igual que todas POXs, lleva en su centro catalítico un grupo hemo de tipo b. Es importante señalar que la densidad electrónica resultante para construir el modelo cristalográfico de ambos monómeros afinados (molécula A y molécula B) sugiere que el grupo hemo de la ZoPrx se encontraba en estado basal en el momento de la cristalización y/o durante la exposición a los Rayos-X, ya que se observa el ion hierro penta-coordinado, con la sexta posición de coordinación libre. Además al igual que todas las POXs conocidas, la estructura de la ZoPrx presenta cuatro puentes disulfuro y el puente salino encubierto (formado por el Asp101 y la Arg125) en ambas moléculas modeladas.

Los elementos estructurales secundarios de la ZoPrx consisten de aquellos típicos de las POXs, los cuales se ilustran en la fig. 9a; La ZoPrx posee 13 α -hélices: La hélice A (residuos Ala16-Gln26), la hélice B (Ile34-Cys46), la hélice C (Phe79-Ala92), la hélice D (Cys99-Leu113), la hélice D' (Gln133-Ser139), la hélice E (Leu147-Ala156), la hélice F (Thr161-Thr172), la hélice F'' (Thr200-Leu209), la hélice G (Asn233-Gln239), la hélice H (Gln246-Asp248), la hélice I (Thr259-Ser268), y la hélice J (Gln270-Gly285), además de una hélice B' (Pro71-Ala73) y dos pequeñas hojas- β , de los residuos Arg175-Ala176 y Thr220-Asn221.

Las coordenadas del modelo tridimensional de la ZoPrx ya fueron depositadas y aprobadas en el *Protein Data Bank in Europe* (PDBe) del EBI bajo el nombre clave *Raphanus sativus anionic peroxidase* asignándosele el código de entrada PDB **4A5G**.

La secuencia de la ZoPrx fue parcialmente obtenida (sólo 104 residuos de a.a.) por dos secuenciaciones en la Unidad de Proteómica-IBt realizadas con dos muestras de la proteína anteriormente purificadas en el laboratorio, en los años 2008 y 2010. El resto de la secuencia fue obtenida por el ajuste manual del modelo estructural sobre el mapa de densidad electrónica junto con un consenso de acuerdo a su comparación con las secuencias de las 7PXs y 50 secuencias de hemo-peroxidasas del UniProt con al menos 58% de identidad; De los todos residuos modelados, 24 de ellos se ajustaron tomando en cuenta al consenso, dado que la densidad electrónica no fue suficiente para discernir la identidad de la cadena lateral a modelar. La secuencia consenso final con un total de 308 residuos de a.a. se presenta en la fig. 10. De acuerdo con la herramienta *ProtParam*

[Gasteiger *et al.*, 2005] del servidor *ExPASy*, el peso molecular calculado a partir de la secuencia de la enzima es de 31945.4 Da sin contar al grupo hemo, a los iones Ca^{2+} ni a las glicosilaciones.

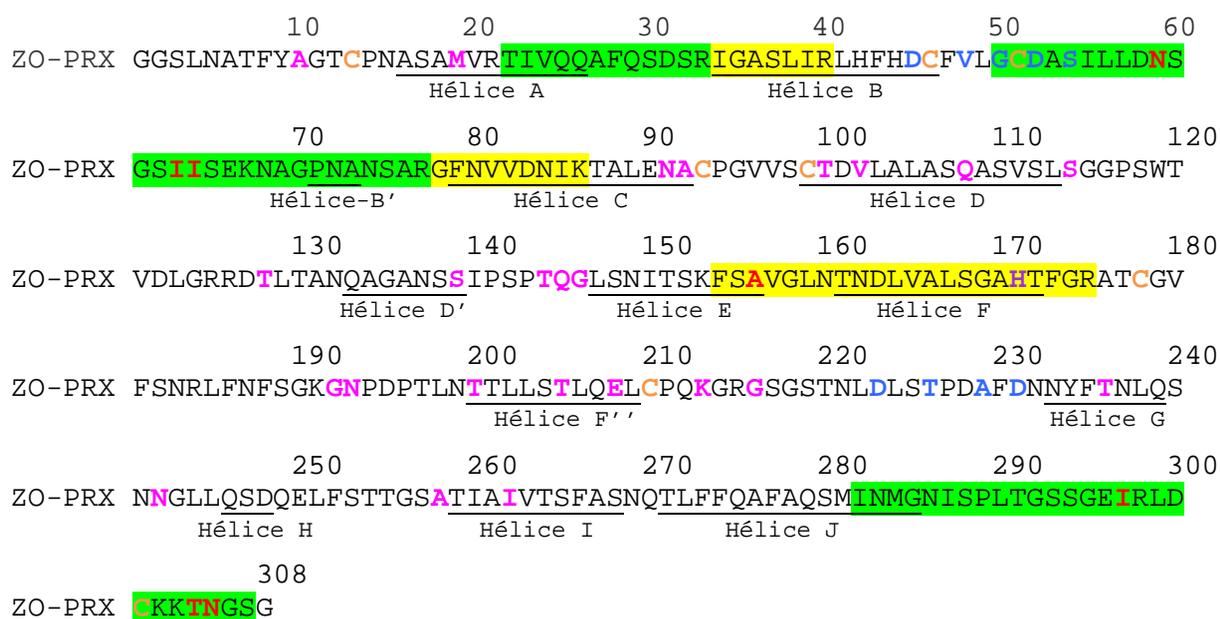


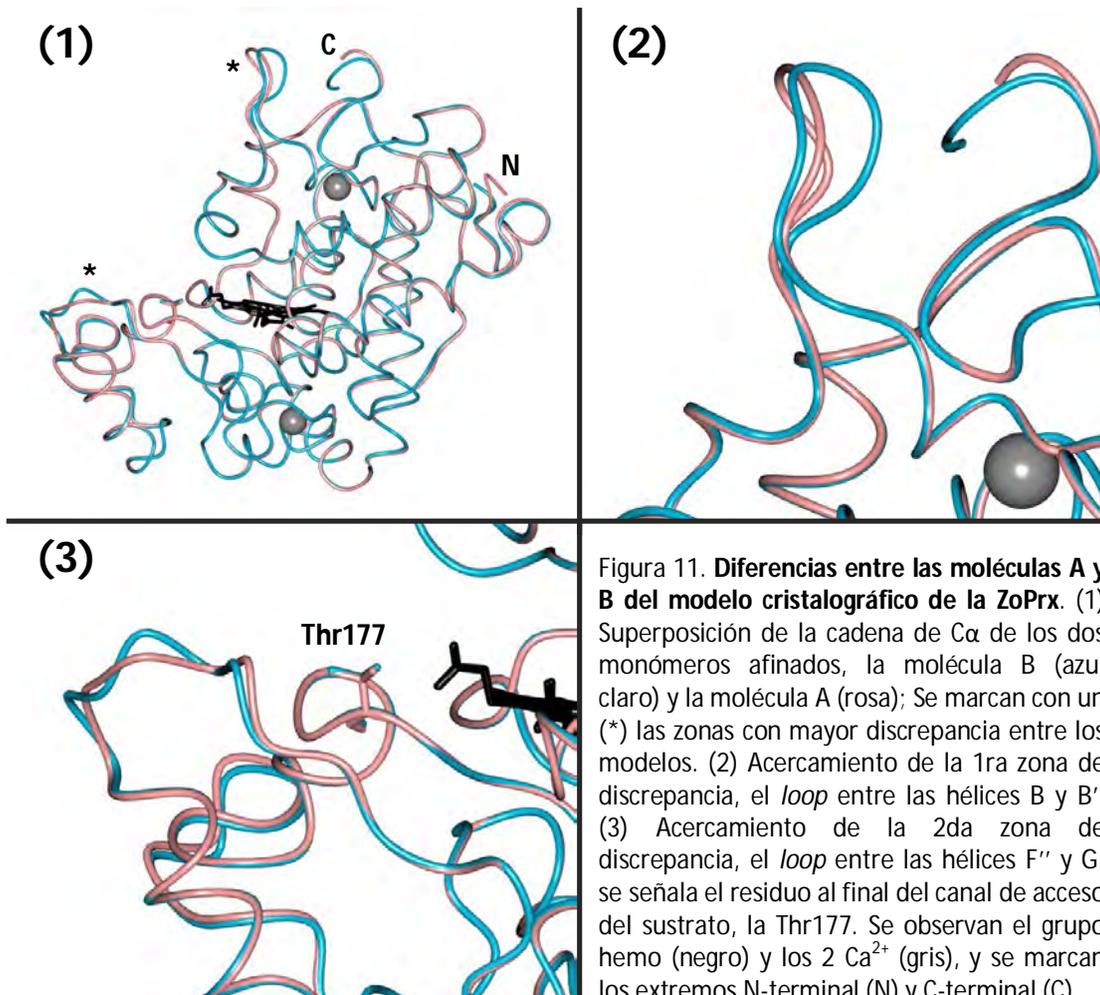
Figura 10. **Secuencia completa final de la Zo-peroxidasa.** Los residuos resaltados en color son los que se obtuvieron en las dos secuenciaciones realizadas, la primera durante el 2008 marcados en amarillo, y la segunda durante el 2010 resaltados en verde. Los residuos destacados en rojo fueron cambiados durante su ajuste manual sobre la densidad electrónica y que difirieron de los residuos asignados en las secuenciaciones. Los residuos destacados en magenta son aquellos que se modelaron según el consenso con las secuencias de los homólogos ya que su respectiva densidad electrónica no era suficiente para identificar el residuo. Además se destaca en morado la histidina proximal perteneciente al sitio activo, y se destacan en naranja las 8 cisteínas que forman los cuatro puentes disulfuro, y en azul los residuos de unión a los Ca^{2+} . La ubicación de las α -hélices se indican en los residuos subrayados.

6.1.1 Discrepancias del modelo cristalográfico

Como ya se mencionó, al realizar el afinamiento de la estructura cristalográfica de la ZoP_{rx}, se modelaron dos monómeros, los cuales llamamos molécula A y molécula B. Al alinear estructuralmente las dos moléculas, se encontraron varias diferencias entre los modelos debidas a la matriz cristalina circundante. La primera diferencia se encuentra en los extremos de la enzima, donde para la molécula A, el extremo N-terminal es un residuo más corto que el extremo N-terminal de la molécula B. Este residuo en la cadena B es la Gly1, que no se modeló en la molécula A ya que

no se observa densidad electrónica adecuada para esto. Mientras que lo contrario se observa en el extremo C-terminal, donde la molécula A es un residuo más largo que la molécula B, siendo este residuo la Gly308, que igualmente no se modeló en la molécula A debido a que faltaba densidad electrónica que así lo permitiera.

Las siguientes diferencias, que corresponden a la primera y segunda zonas de mayor y única discrepancia al superponer ambas moléculas se localizan en dos *loops* (ver fig. 11.2 y 11.3). El primer *loop* se ubica entre las hélices B y B', siendo los residuos Asn57-Ile64, mientras que el segundo *loop* se haya entre las hélices F'' y G, siendo los residuos Pro211-Thr219. Ambos casos de discrepancia se atribuyen a que la densidad electrónica que se obtuvo correspondiente a cada *loop* en la molécula B es casi nula, por lo que los residuos en estas zonas se modelaron de acuerdo con lo observado en la molécula A, ya que la densidad electrónica de los *loops* con discrepancia en la molécula A es mucho mejor. Y es por esto último que la molécula A se tomó como base para realizar todos los alineamientos y comparaciones estructurales con las enzimas homólogas a la ZoPrx.



6.1.2 Sitio activo, iones Ca^{2+} y puentes disulfuro

La estructura de la ZoPrx en estado nativo posee un sitio activo con un ion hierro coordinado por los cuatro nitrógenos del anillo de porfirina más el residuo His171 –la His proximal– que está a una distancia de 2.21 Å del hierro en la cavidad proximal. La molécula de agua más cercana en la cavidad distal está a 3.99 y 3.88 Å de distancia (molécula A y B, respectivamente) del Fe^{3+} , lo cual indica que el hierro está penta-coordinado con la sexta posición de coordinación libre (ver fig. 12).

Desde el trabajo de Schuller *et al.* (1996) se empezó a aceptar el hecho que los sustratos que interactúan con hemo-peroxidasas lo hacen vía el borde expuesto del hemo; Las moléculas de sustrato se unen covalentemente al carbón δ -*meso* del hemo que está orientado hacia la ruta de acceso que lleva al bolsillo del hemo. Los residuos que rodean este canal de acceso del sustrato en la ZoPrx son Gly70, Pro71, Ala73, Ile140, Pro141, Ser142, Pro143, Thr144, Gln145, Thr177, Gly179, Val180, Ser182 y Leu245.

Se encontraron dos iones calcio estructuralmente conservados en ambas moléculas. El Ca^{2+} distal está posicionado a 15.72 Å del ion hierro del hemo y se encuentra hepta-coordinado. Sus siete ligandos son Asp45 O, Asp45 O_D, Val148 O, Gly50 O, Asp52 O_D, Ser54 O_G y una molécula de agua. El Ca^{2+} proximal está posicionado a 13.41 Å del ion hierro del hemo y también se encuentra hepta-coordinado. Sus siete ligandos son Thr172 O, Thr171 O_G, Asp223 O_{D2}, Thr226 O, Thr226 O_G, Ala229 O y Asp231 O_D. La distancia entre ambos Ca^{2+} es de 26.74 Å.

En la secuencia de la ZoPrx se hayan ocho cisteínas (Cys13, -46, -51, -93, -99, -178, -210 y -301), las cuales todas dan lugar a cuatro puentes disulfuro (que se forman por la unión covalente de los grupo tioles) (ver fig. 13). El primer puente, llamado a partir de aquí SS-1, se forma con la Cys13, que se haya a un residuo de distancia de la hélice A, y el grupo tiol de la Cys93, que se

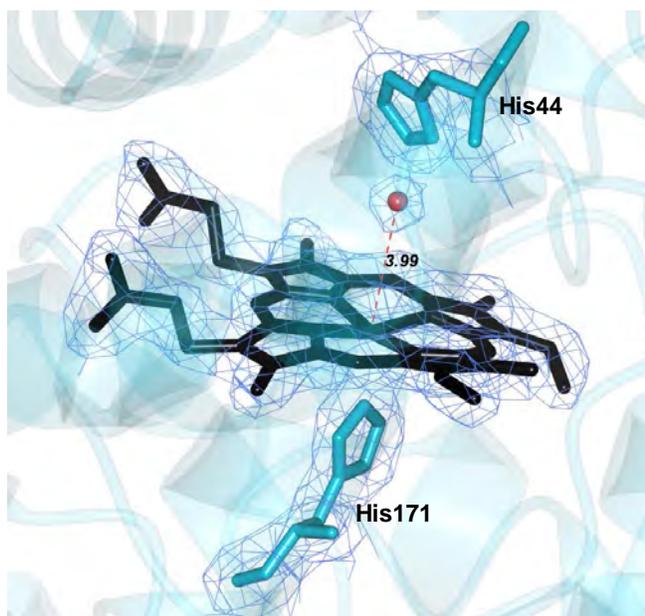


Figura 12. Sitio activo de la Zo-Prx en estado basal, donde se observa el grupo hemo (negro), y las histidinas proximal y distal. Se marca la distancia (línea roja punteada, 3.99 Å, para la molécula A) entre el ión hierro y la molécula de agua (esfera roja) más cercana. Se presenta su densidad electrónica respectiva (red azul; mapa $2F_o - F_c$ a 1σ).

encuentra justo después de la hélice C. El segundo puente, SS-2, se forma por el enlace entre la Cys46, que está justo en el final de la hélice B, y la Cys51 que está después de la misma hélice. El tercer puente, SS-3, está formado por la Cys99, que está justo en el inicio de la hélice D, y la Cys301, que se encuentra muy cerca del extremo C-terminal. Y el cuarto puente, SS-4, es formado por la Cys178, cerca del final de la hélice F, y la Cys210 que está justo después del final de la hélice F''.

El puente disulfuro SS-1 se encuentra expuesto al solvente, en el dominio I, muy cerca del extremo C-terminal. El SS-2 se encuentra embebido en la enzima, y el *loop* que mantiene conectado contiene parte de los residuos que coordinan al Ca^{2+} distal. El SS-3, al igual que el SS-2, está protegido del contacto directo del solvente, también en el dominio I. Y el SS-4, se ubica muy cerca de la superficie, parcialmente expuesto al solvente, en la parte inferior del dominio II.

En la molécula A, las Cys93, -99, -178 y -301 poseen dos conformaciones alternas (o rotámeros), lo cual resulta en la formación de dos conformaciones alternas de los puentes disulfuro SS-1 y SS-4 (ver fig. 13a y d). Y aunque lo mismo se esperaría para el SS-3, la densidad electrónica en este punto sugirió que los rotámeros de las cadenas laterales de la Cys99 y Cys301 se encuentran

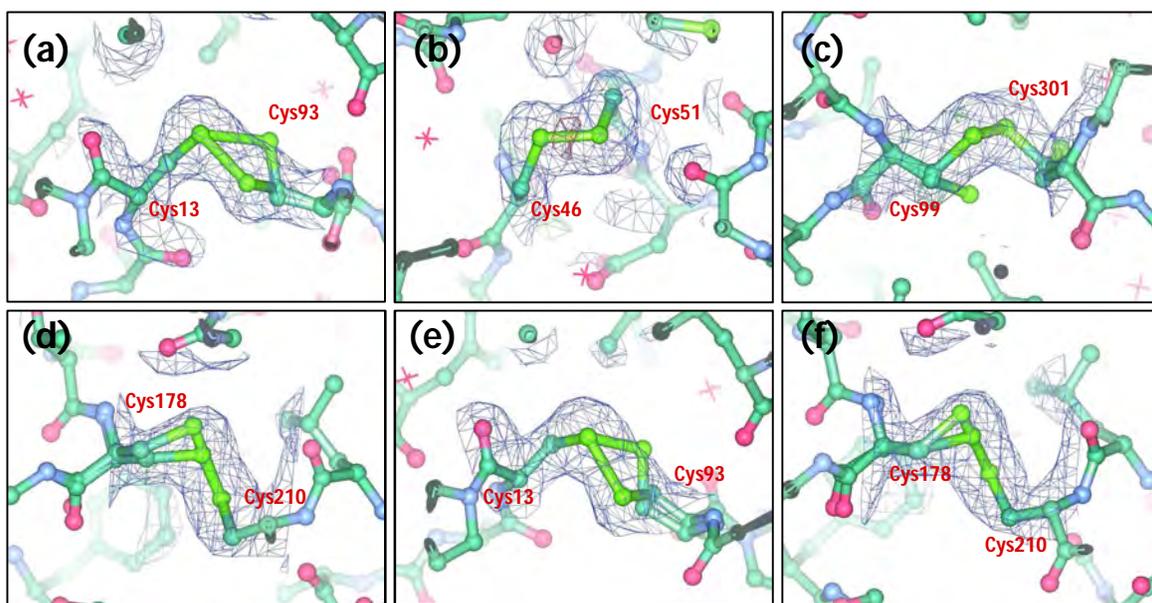


Figura 13. **Puentes disulfuro presentes en la ZoPrx.** Se observan en verde lima los azufres de los residuos de cisteína –etiquetadas en rojo– que forman los puentes disulfuro, y se presenta su respectiva densidad electrónica (red azul fuerte; mapa $2F_o-F_C$ a 1σ); (a) Puente disulfuro SS-1; (b) Puente disulfuro SS-2 (se observa densidad negativa –mapa F_o-F_C a -3.5σ – representada por una red roja, lo que indica que este enlace no está presente en todas las copias de la enzima dentro del cristal); (c) Puente disulfuro SS-3; (d) Puente disulfuro SS-4. Todos los anteriores presentes en la molécula A. (e) Puente disulfuro SS-1; (f) Puente disulfuro SS-4; Los dos anteriores presentes en la molécula B.

apuntando hacia fuera, por lo que los azufres están a una distancia que no permite la formación del puente, es decir que están reducidas (ver fig. 13c). En la molécula B, sólo la Cys93 y Cys178 poseen dos rotámeros, lo que también resulta en la formación de dos conformaciones alternas de los puentes disulfuro SS-1 y SS-4 (ver fig. 13e y f).

6.1.3 Glicosilaciones

Se halló densidad electrónica correspondiente a *N*-glicosilaciones en siete diferentes sitios correspondientes a Asn-X-

Ser/Thr (X no es Pro), de ocho sitios de *Ngly* predichos *in silico* empleando *GlyProt*. Los ocho sitios de *Ngly* corresponden a las asparaginas 5, 15, 137, 149, 187, 199, 269 y 306, de los cuales, el último no presentó densidad electrónica que indicara que hubiera una *Ngly* en este sitio. Los otros siete sitios se afinaron para cada molécula modelada de la ZoPrx. Cada cadena de *N*-glicanos (compuesta de *N*-acetilglucosamina o GlcNAc, fucosa, manosa y xilosa) resultó distinta tanto en tamaño como posición, al ajustarse a la densidad electrónica observada para cada sitio. La mayor forma de glicano afinada en la ZoPrx posee una estructura $\text{Man}\alpha 3(\text{Xyl}\beta 2)\text{-Man}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 4(\text{Fuc}\alpha 3)\text{GlcNAc}$ -. Esta estructura podría corresponder a *N*-glicanos del tipo complejo o del tipo truncado (ver figs. 5 y 14). De todas las POXs con estructuras cristalográficas disponibles, la ZoPrx es la que presenta, con una gran diferencia, el mayor número de *N*-glicanos modelados. Y posiblemente sea una de los depósitos en el PDB con mas *N*-glicanos modelados con relación al número de residuos de aminoácidos.

Cada uno de los siete sitios de *Ngly* encontrados en la ZoPrx están posicionados en regiones de *loops*, que son exteriores al centro de la enzima y son accesibles al solvente (ver fig. 15). Todos estos sitios de glicosilación apuntan hacia fuera de la molécula, y se encuentran distribuidos uniformemente por toda la superficie de la enzima, lo cual sugiere, de acuerdo con Gajhede *et al.* [1997] y Schuller *et al.* [1996], que el mayor propósito de estas glicosilaciones es aumentar la solubilidad de la enzima en agua y tal vez incrementar la reticulación proteica inducida por radicales libres, y que la ubicación de las glicosilaciones en la estructura, sugiere que los azúcares no poseen ningún efecto en la actividad de la ZoPrx pero puede que se afecte en alguna medida la estabilidad, como apunta el trabajo de Tams y Welinder [1995] donde la deglicosilación de la HPRC no afecto su actividad pero si su estabilidad contra proteólisis y su solubilidad.

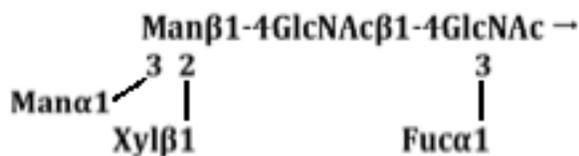


Figura 14. Estructura de la cadena de *N*-glicanos más larga que pudo afinarse en el modelo de la ZoPrx.

El sitio de unión del glicano llamado Ngly-1 (porque solo presenta un azúcar, una GlcNAc) en la Asn149 se encuentra aproximadamente a 11 Å del borde δ -*meso* expuesto del hemo, sin embargo la cavidad distal del sitio activo se encuentra protegida de este sitio glicosilado por las cadenas laterales de los residuos Gln145 e Ile150. Este carbohidrato, de acuerdo con Schuller *et al.* (1996), puede que interfiera con la unión de moléculas grandes a la cavidad distal de la enzima (como se postuló para la PNP), pero puede que no influya en el acceso de sustratos de tamaño pequeño al borde del hemo.

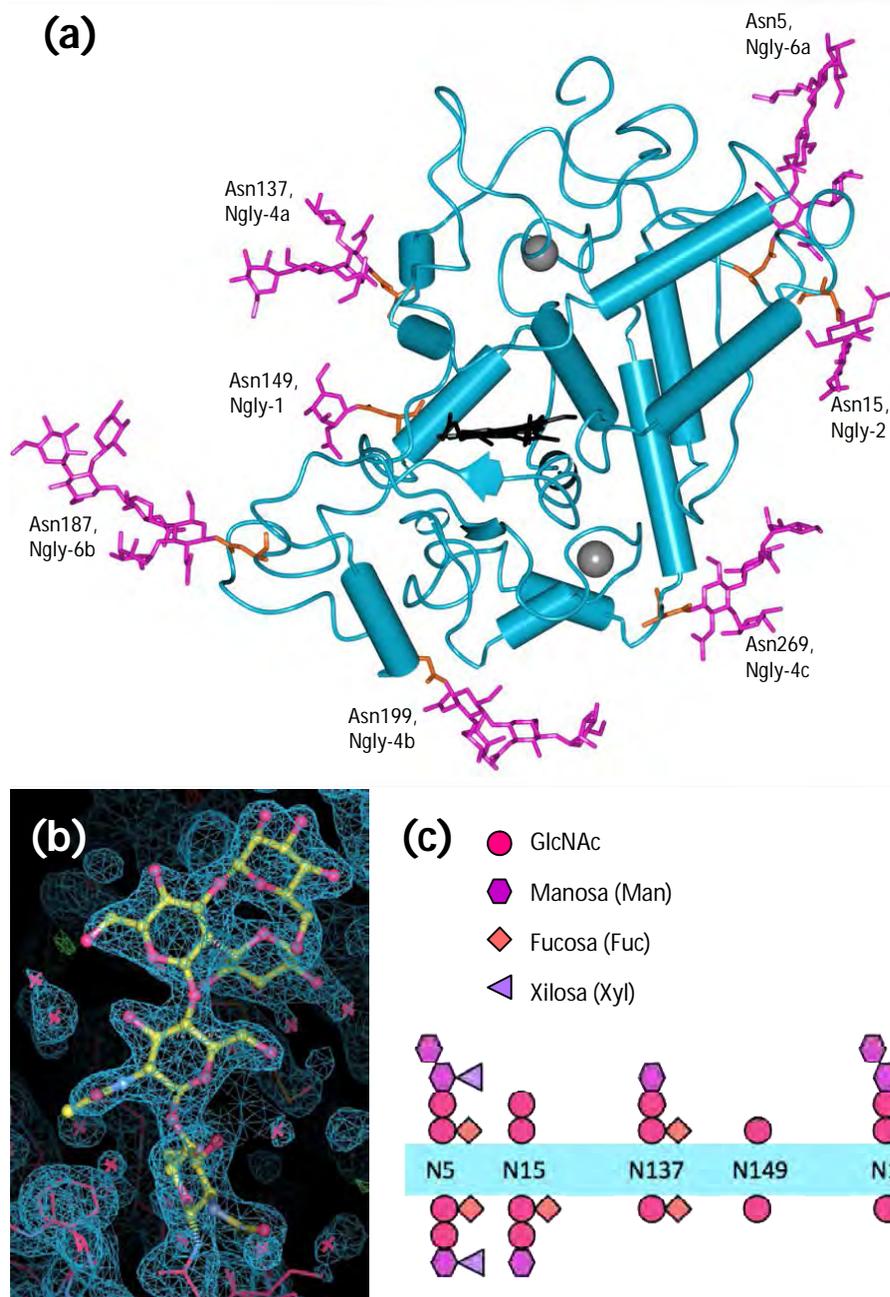


Figura 15. **N-glicosilaciones presentes en la ZoPrx.** (a) Representación de Richardson donde se observa la ubicación de las 7 cadenas de *N*-glicanos (magenta) ligadas a su respectiva Asn (naranja), se indica el nombre designado a cada cadena de acuerdo con el número de oligosacáridos que contiene. (b) Modelo 3D del *N*-glicano Ngly-6a que se encuentra ligado a la Asn5 con su respectiva densidad electrónica (red azul, mapa $2F_o-F_c$ a 1σ) en la molécula A. [Imagen tomada directamente en *Coot*] (c) Esquemización de los 7 *N*-glicanos modelados en los 2 monómeros de la ZoPrx. Los sitios de Ngly que apuntan hacia arriba corresponden a la molécula A, mientras que los que apuntan hacia abajo corresponden a la molécula B.

6.2 Comparación secuencia-estructura de la ZoPrx con sus homólogas

La superposición y el alineamiento estructural de POXs demostró que la ZoPrx es similar a las estructuras previamente determinadas de la PRX aniónica de *A. thaliana* 2 (ATP A2), la PRX del frijol de soja (SBP), la PRX de rábano picante isoenzima C (HRPC), la PRX de *A. thaliana* isoenzima N (ATP N), la PRX catiónica mayor de cacahuate (PNP), la PRX del grano de cebada (BP 1) y la PRX de palmera real (RPTP) –en conjunto referidas en este trabajo como 7PXs–. La ZoPrx posee el mismo plegamiento típico de la Clase III de PRXs que presentan todas las 7PXs (ver fig. 18).

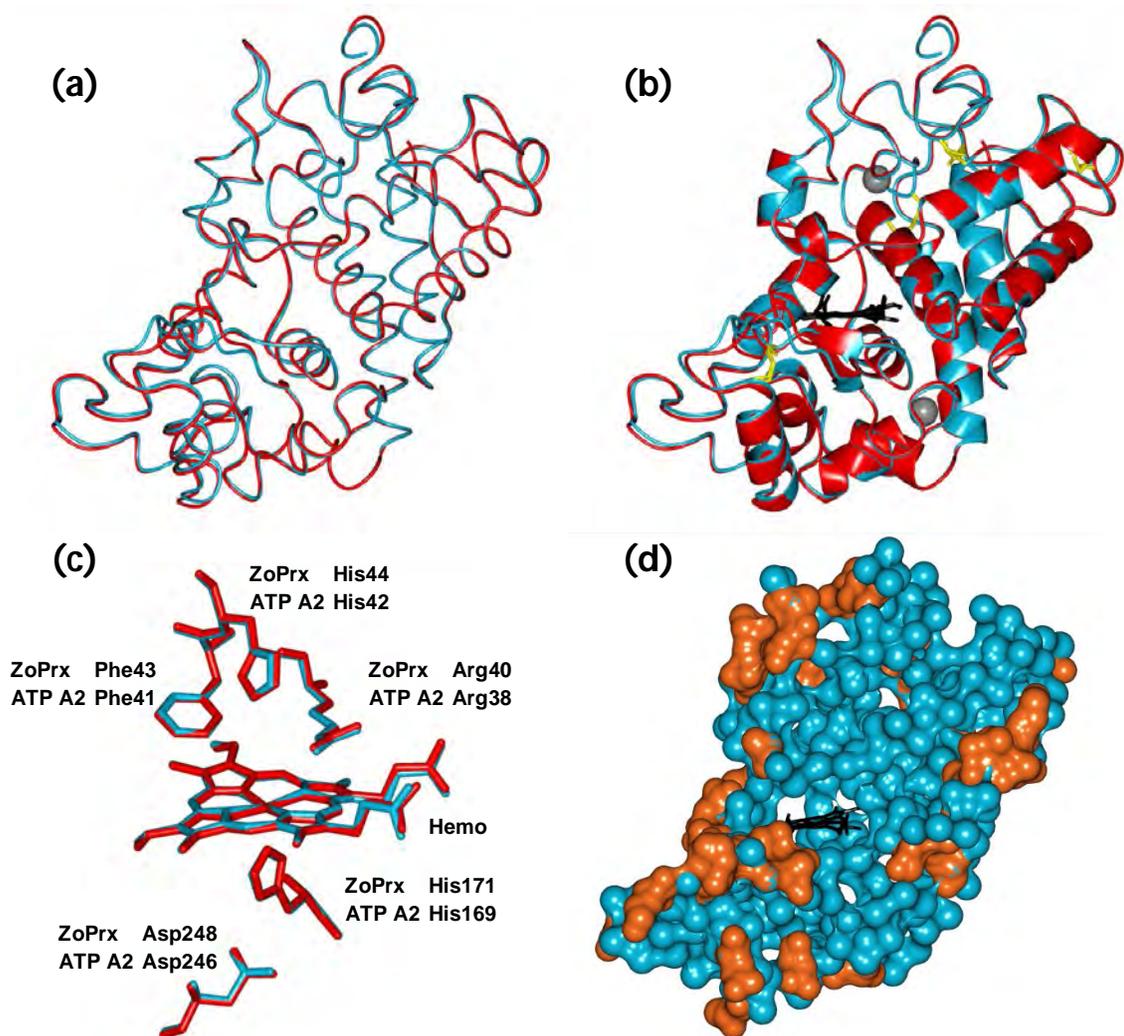


Figura 16. **Sobrelapamiento de las estructuras cristalográficas de la ZoPrx (azul claro) y la ATP A2 (rojo).** (a) Representación de las cadenas de α . (b) Representación de listón, donde se observan el grupo hemo (negro), los iones Ca^{2+} (gris) y los puentes disulfuro (amarillo). (c) Sitio catalítico de las enzimas donde se observan los residuos más relevantes. (d) Modelo de la superficie de la ZoPrx donde se resaltan en naranja los residuos que difieren de aquellos en la misma posición en la ATP A2.

Tanto la secuencia como la estructura de la ZoPrx se encontró muy similar a la ATP A2 (se ilustra en la fig. 16), con una desviación de la R.M.S. de 0.49 Å con respecto a las posiciones de los C α de entre 306 residuos superponibles –el total de los residuos de la ATP A2–. Las secuencias de ambas enzimas arrojaron un porcentaje de identidad del 87%, realizado con el programa NCBI-BLAST del EBI (ver fig. 19). Las desviaciones de R.M.S. y el porcentaje de identidad de las 7PXs con respecto a la ZoPrx se pueden ver en la tabla 3. Todos los residuos que difieren entre la ZoPrx y la ATP A2 (39 residuos en total) son accesibles al solvente (ver fig. 16d), excepto las treoninas 100 y 177 (Cys98 y Arg177 en la ATP A2, respectivamente), lo cual supone que el empaquetamiento interno de ambas POXs es similar. La ZoPrx y la ATP A2 presentan una distribución similar de elementos estructurales secundarios (ver fig. 16b); Ambas POXs carecen de la hélice F', pero conservan la hélice B' presente en las PRXs de las Clases I y II. Las demás hélices (A-J) tienen posiciones y longitudes bastante similares, aunque la hélice H es mucho más corta en la ZoPrx (Gln246-Asp248) que su equivalente en la ATP A2 (Gln244-Ser251). Las hojas- β son solo un residuo más corto que en la ATP A2 (Arg173-Arg175 e Ile217-Asn219).

El sitio activo de la ZoPrx, incluyendo las posiciones del grupo hemo y de los residuos de importancia al sitio catalítico His44 y Arg40, es muy similar al sitio activo de la ATP A2 (ver fig. 16c) y al resto de las 7PXs, que también presentan la His proximal, y la His y Arg distales con posiciones bastante similares. El canal de acceso del sustrato en la ZoPrx presenta varias substituciones comparándola con el canal de acceso del sustrato de la ATP A2, siendo las substituciones ATP A2 \rightarrow ZoPrx: Val71 \rightarrow Ala73, Ile142 \rightarrow Thr144, Glu143 \rightarrow Gln145, Arg175 \rightarrow Thr177, y Asn180 \rightarrow Ser182, mientras que los demás residuos que forman el canal se conservan. Una característica en común en todas las POXs, es la presencia de un bolsillo hidrofóbico formado por un agrupamiento de residuos aromáticos (fenilalaninas altamente conservadas) que rodean al grupo hemo y que causan una moderada proyección del segmento correspondiente a las α -hélices F'/F'' hacia el solvente [Watanabe *et al.*, 2010]. En la ZoPrx, los residuos en el bolsillo son Phe43, Phe47, Gln145 y Phe154 en el dominio distal, y Phe173, Leu222, Phe230 y Phe277 en el dominio proximal (ver fig. 17). El cambio de una Phe por una

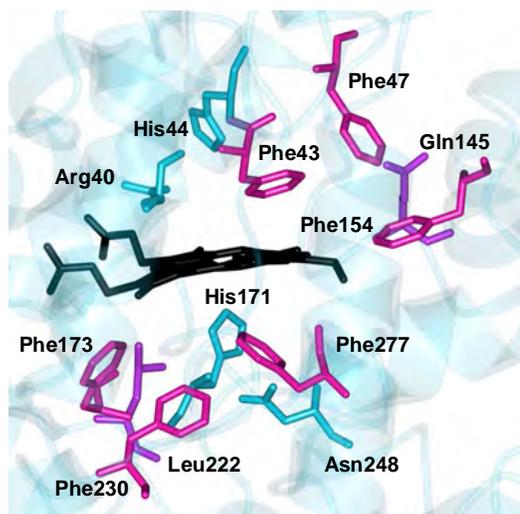


Figura 17. Ambiente del grupo hemo (negro) en la ZoPrx con los residuos que forman el bolsillo hidrofóbico (rosa), se resaltan la Gln145 y Leu222 en morado. Se observan también los residuos importantes del sitio catalítico (azul).

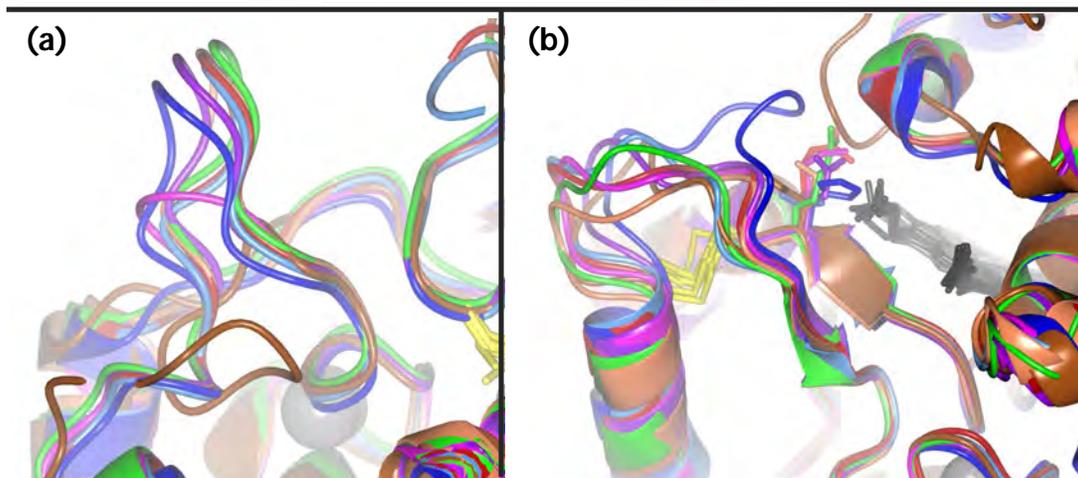
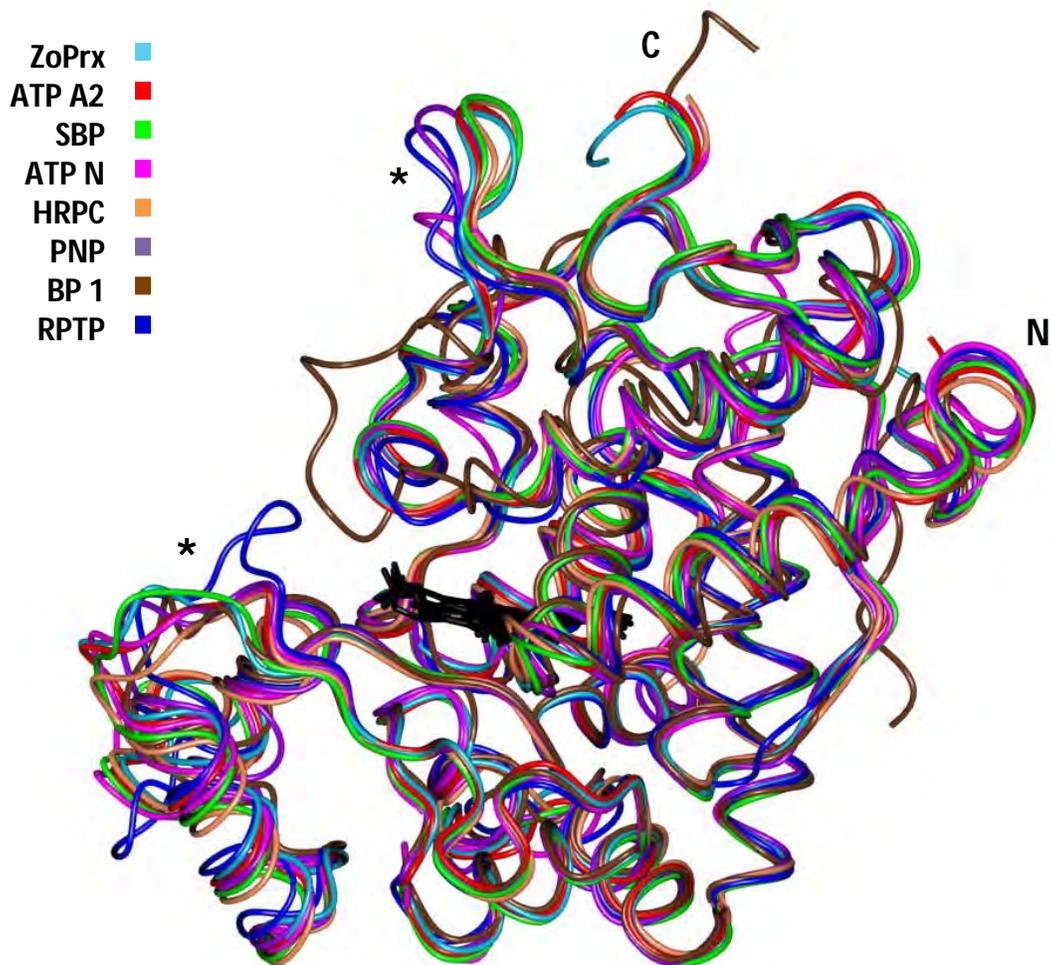


Figura 18. **Alineamiento estructural de la ZoPrx y las 7PXs.** La figura de arriba equivale a la superposición de la cadena de α de cada enzima indicada en diferentes colores; ZoPrx: azul claro, ATP A2: rojo, SBP: verde, ATP N: magenta, HRPC: naranja, PNP: morado, BP 1: café, y RPTP: azul marino. Se señala con un (*) las zonas de mayor discrepancia entre las estructuras. (a) Acercamiento de la 1ra zona de discrepancia, el *loop* entre las hélices B y C. (3) Acercamiento de la 2da zona de discrepancia, el *loop* entre las hélices F' y G, se observan el puente disulfuro SS-1 de la ZoPrx y sus equivalentes en las demás estructuras, y el residuo al final del canal de acceso del sustrato. Se observan el grupo hemo (negro) y el Ca^{2+} distal (gris), y se marcan los extremos N-terminal (N) y C-terminal (C).

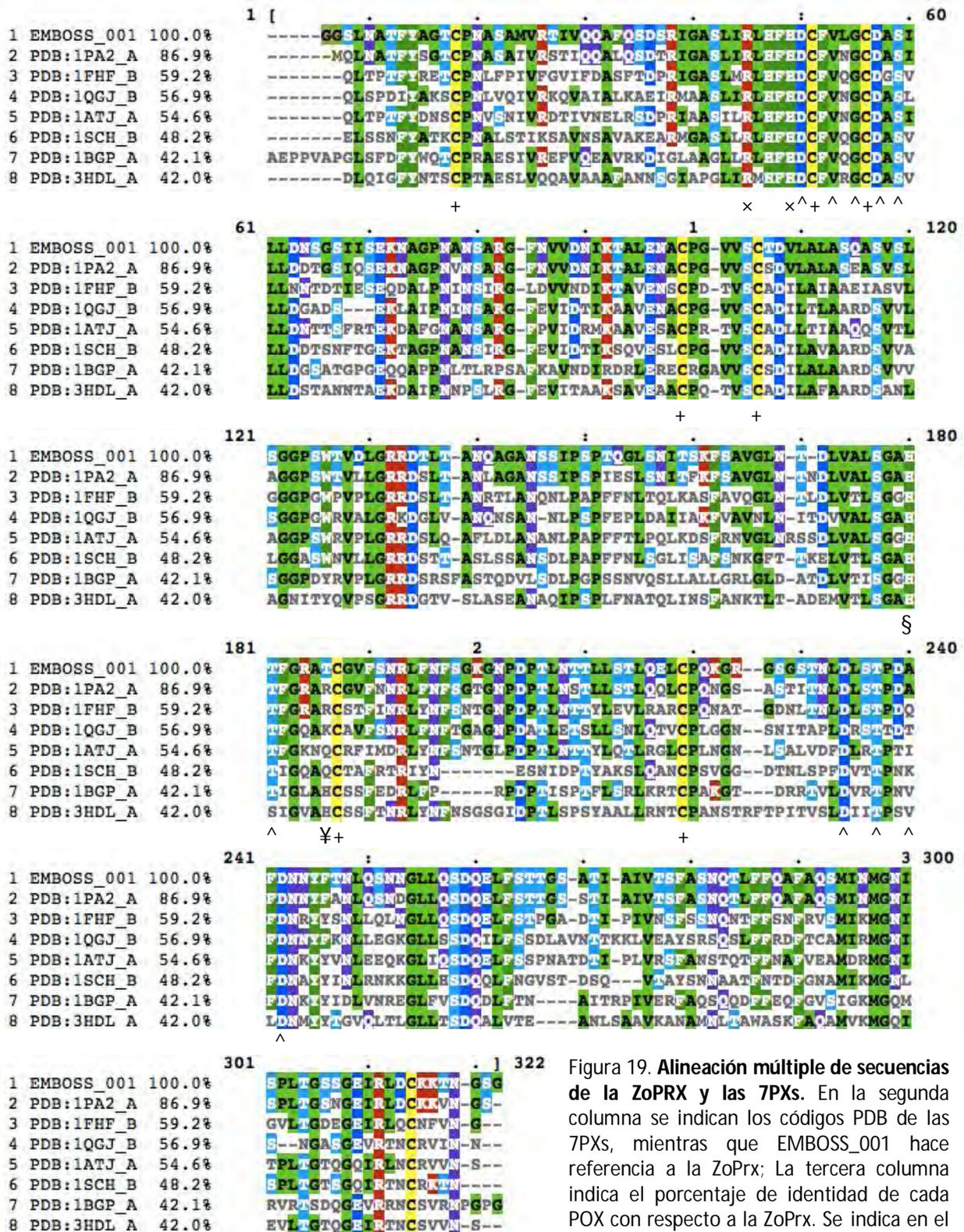


Figura 19. Alineación múltiple de secuencias de la ZoPRX y las 7PXs. En la segunda columna se indican los códigos PDB de las 7PXs, mientras que EMOSS_001 hace referencia a la ZoPrx; La tercera columna indica el porcentaje de identidad de cada POX con respecto a la ZoPrx. Se indica en el último renglón la ubicación de los residuos relevantes; La His proximal se resalta con (\$), la His y Arg distales con (x), los residuos ligandos a los dos Ca²⁺ con (^), las ocho Cys que forman los puentes disulfuro con (+), y el residuo que se ubica al final del canal de acceso al sustrato (¥).

la His y Arg distales con (x), los residuos ligandos a los dos Ca²⁺ con (^), las ocho Cys que forman los puentes disulfuro con (+), y el residuo que se ubica al final del canal de acceso al sustrato (¥).

Gln (posición 145 en la ZoPrx) en el dominio distal, y por una Leu (posición 222 en la ZoPrx) en el dominio proximal también es compartido por la ATP A2 y ATP N. La Gln, siendo un residuo hidrofílico, de acuerdo con Henriksen *et al.* [2001] provoca que el bolsillo hidrofóbico se compacte y que la proyección del segmento de α -hélices F'/F'' se retraiga.

La mayor discrepancia entre las estructuras de la ZoPrx y la ATP A2 se encuentra en un *loop* expuesto a la superficie ubicado entre las hélices F'' y G; Las POXs contienen una larga inserción entre las hélice F y G que es mantenida por un puente disulfuro (en la ZoPrx, este puente disulfuro corresponde al llamado SS-4); Esta inserción contiene las hélices F' y F'', y por lo general es hipervariable [Gajhede, *et al.*, 1997]. Al superponer las estructuras de la ZoPrx y la ATP A2, se puede observar a simple vista una variación importante, que tiene lugar al terminar la hélice F'', justo después de la Cys210 o la Cys208, respectivamente, y que formaría parte de la inserción arriba mencionada. Es importante notar que este *loop* variable corresponde a la segunda zona de discrepancia observada entre las moléculas A y B de la ZoPrx. Este *loop*, entre las hélices F'' y G, es de ocho residuos de largo tanto en la ZoPrx y la ATP A2, de los residuos Pro211 a Thr219 y Pro208 a Thr216, respectivamente, aunque difieren en tres de ellos. Es más, al superponer las 8 estructuras de POXs (la ZoPrx y las 7PXs) se puede observar claramente la alta variación de las estructuras en este *loop*, que varía en largo para cada enzima (ver fig. 18b).

Además del *loop* variante anterior, también se puede observar en la fig. 18a una gran zona de discrepancia en la superposición de las ocho estructuras que correspondería al *loop* ubicado entre las hélices B y C (o antes entre la hélice B' en caso de presentarla como en la ZoPrx y la ATP A2).

Tabla 3. **Estadística del alineamiento estructural de la ZoPrx contra las 7PXs.** Para obtener el valor de la R.M.S.D. se usó el método *SSM* en el programa *CCP4mg*; Para el porcentaje de identidad se empleó *NCBI-BLAST*.

POX	Largo (residuos de a.a.)	R.M.S.D. / Total de residuos superponibles	% de Identidad
ATP A2	306	0.49 / 306	87%
SBP	304	0.91 / 302	59%
ATP N	300	0.96 / 286	57%
HRPC	306	1.00 / 303	54%
PNP	294	0.97 / 292	50%
BP 1	309	1.13 / 284	44%
RPTP	304	1.13 / 296	42%

La ZoPrx presenta los iones Ca^{2+} y los puentes disulfuro en posiciones muy similares con respecto a todas sus enzimas homólogas. Ambos iones Ca^{2+} se encuentran en las mismas posiciones relativas con respecto al grupo hemo tanto en las 7PXs como en los demás miembros de las POXs y de las clases I y II. La ZoPrx y las 7PXs comparten los mismos residuos en la hepta-coordinación de los calcio, los cuales se unen a cada residuo por el grupo carbonil y/u oxígeno de sus cadenas laterales. El Ca^{2+} distal emplea como ligandos una Asp (doble ligando), una Val, una Gly, otra Asp, una Ser y una molécula de agua. El Ca^{2+} proximal utiliza como sus ligandos a una Thr (doble ligando), una Asp, otra Thr (que también actúa como doble ligando), una Asp y el último ligando es un residuo que varía entre la ZoPrx (una Ala) y las 7PXs (p.e. una Gln en la SBP, o una Lys en la PNP).

Todas las cisteínas presentes en las 7PXs forman puentes disulfuro, los cuales emparejan sus respectivas Cys equivalentes a las de la ZoPrx. Estos cuatro puentes disulfuro conservados en todas las POXs, se encargan de conferirles mayor rigidez a estas enzimas.

Se encontró que la ZoPrx está altamente glicosilada, lo cual es común en peroxidases nativas de plantas. Su estructura tridimensional muestra 7 sitios de *N*-glicosilación posicionados en regiones de *loops* que apuntan hacia fuera de la molécula y hacia el solvente. En algunas 7PXs, se han hallado varios sitios de *N*gly, aunque al igual que en la ZoPrx, solo se observan parcialmente glicosilados. En la ATP A2 se han predicho 9 sitios de *N*gly [Nielsen *et al.*, 2001], de los cuales 7 corresponden a los encontrados en la ZoPrx. La HRPC posee 8 *N*-glicanos [Welinder, 1979], de los cuales solo 3 sitios se corresponden con 3 de la ZoPrx; La SBP también posee 7 *N*-glicanos [Welinder & Larsen, 2004] pero solo 2 sitios de *N*gly equivalen a 2 sitios en la ZoPrx; Y la RPTP y la PNP poseen 9 y 3 sitios de *N*gly respectivamente [Watanabe *et al.*, 2010; van Huystee *et al.*, 2002], pero ambas solo comparten uno con la ZoPrx.

El grupo prostético de las POXs, un hemo b, además de unirse por su ion hierro a la His proximal mediante un puente de H, también mantiene este tipo de enlace con otros cinco residuos por los oxígenos de los propionatos de la ferriprotoporfirina IX. Estos residuos son la Arg33, la Ser 37, la Ser75, la Arg175 y la Thr177 en la ZoPrx. Conjuntamente, el hemo interactúa mediante contactos hidrofóbicos con todos los residuos que lo rodean, tanto de la cavidad distal como la proximal. Las interacciones entre el grupo prostético y los residuos que lo cercan se pueden ver en la fig 20, la cual fue generada mediante el programa *LigPlot* del EBI [Wallace *et al.*, 1996]. Al comparar los residuos que interactúan con el hemo en la ZoPrx con los que lo hacen en su homóloga más cercana, la ATP A2, se encontró que solo un residuo difería. En la ZoPrx, este residuo es la

Thr177, el cual se enlaza de su N por **un** puente de H al grupo propionato que se une al C_{2A} del hemo mediante el O_{2A}, a diferencia de la Arg175, el residuo equivalente en la ATP A2, donde el O_{2A} del propionato está formando **dos** enlaces de H, uno al N y otro al N_{H1} de esta Arg. Fuera de esta diferencia, ambas proteínas presentan los mismos enlaces de H y los mismos contactos hidrofóbicos con los mismos residuos.

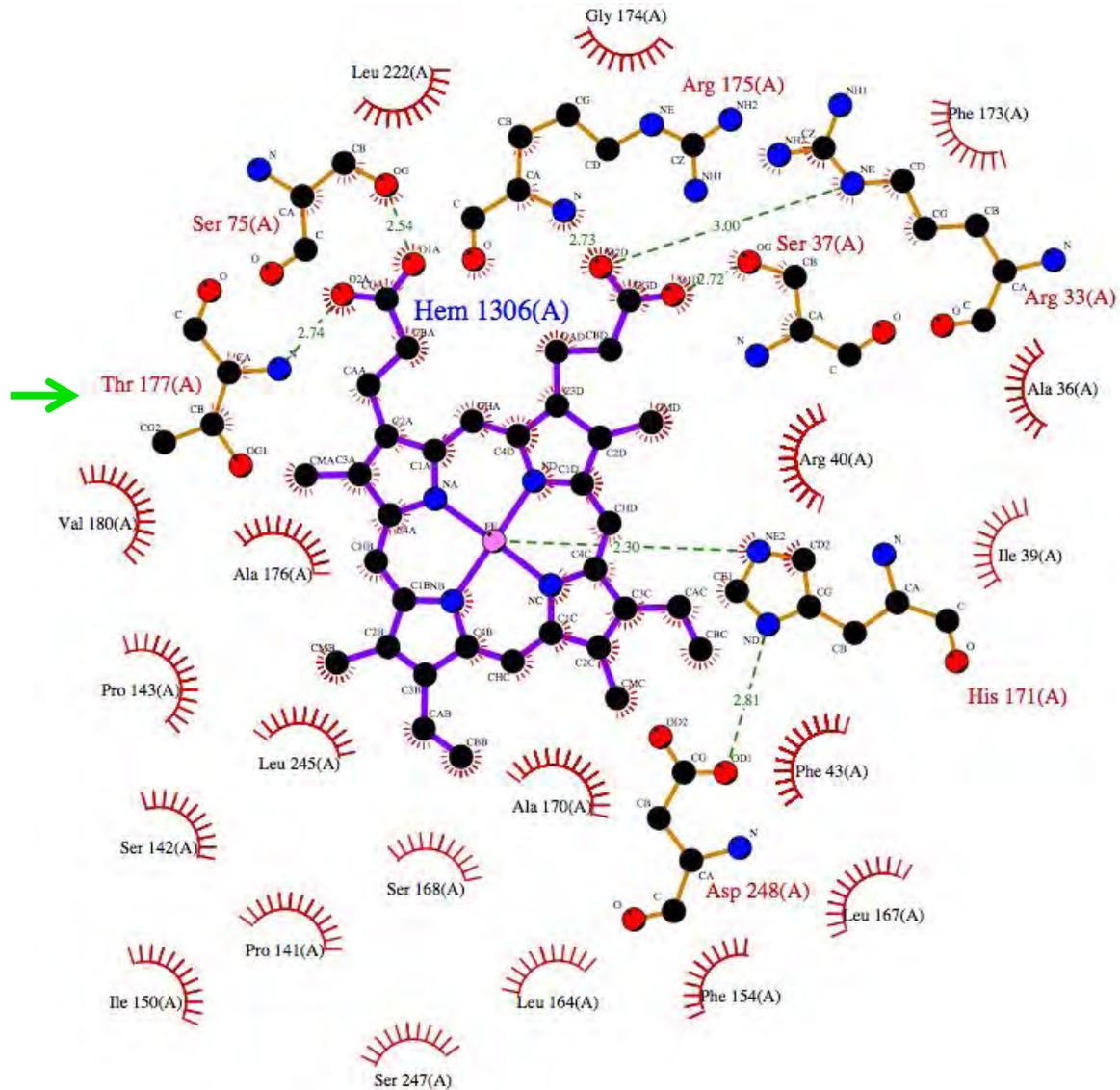


Figura 20. **Diagrama bidimensional de las interacciones proteína-grupo prostético de la ZoPrx.** Las interacciones que se presentan son aquellas mediadas por puentes de hidrógeno (líneas punteadas verdes, se indica la distancia en Å) y por contactos hidrofóbicos (arcos rojos con líneas radiales apuntando hacia los átomos ligados que contactan). Se observan la His171 –His proximal– unida por un enlace de coordinación al hierro y su unión al Asp248. Se indican 20 de los 21 residuos que contactan hidrofóbicamente al hemo, faltando la Arg77 en el diagrama. La ‘A entre paréntesis’ hace referencia a la molécula A del modelo estructural. Se resalta con una flecha verde la Thr177.

Al dirigir nuestra atención a la Thr177 en la ZoPrx, recordamos que este a.a. es parte de los residuos que forman el canal de acceso del sustrato hacia el sitio activo. Al observar de cerca su disposición en el modelo cristalográfico, se aprecia la posición de su cadena lateral justo de frente al hemo viéndolo por la apertura que dispone la estructura hacia el sitio activo, justo al final del canal de acceso del sustrato. Cuando se realizó lo mismo con su sustitución equivalente en la ATP A2, la Arg175, que se ubica en el mismo lugar, se advirtió que su cadena lateral forma un bloqueo parcial en la apertura hacia el grupo hemo. Esto se puede apreciar en la estructura cristalográfica mediante una representación de la superficie electrostática para ambas enzimas, lo cual se muestra en la fig. 21.2 y 21.4.

Consecutivamente se encontró que todas las demás 7PXs poseían un residuo distinto en la posición de la Thr177 de la ZoPrx, pero que casi todos los demás residuos que rodean al hemo se conservan; Ningún otro residuo que forma puentes de H con los propionatos cambia, pero se sigue manteniendo la diferencia de que la Thr177 mantiene sólo un puente de H con el propionato del lado δ -meso del hemo, mientras que el residuo equivalente para el resto de las 7PXs forma dos enlaces del mismo tipo con el mismo propionato. Esta diferencia en la interacción entre el propionato del hemo y la cadena polipeptídica podría influenciar la estabilidad y las propiedades catalíticas [Watanabe *et al.* 2010]. El residuo que cambia de la Thr177 en la ZoPrx en el resto de las 7PXs es: Para la SBP, Arg175; HRPC, Gln176; ATP N, Lys171; PNP, Gln175; BP 1, His185; y 3HDL, His175. Estos residuos difieren en que son neutros hidrofílicos (Thr y Gln) o básicos (Arg, Lys e His), pero la característica que tienen en común es que todos poseen una cadena lateral relativamente larga en comparación con la de la Thr. Y es por eso que al comparar la disposición de estos residuos en su respectivo modelo al final del canal de acceso del sustrato, nos encontramos con la misma situación vista en la ATP A2, que consiste en que este residuo bloquea parcialmente el acceso, lo cual puede observarse a simple vista en una representación de la superficie electrostática de esta zona en cada estructura cristalográfica (ver fig. 21). Resulta que la disposición de la superficie de los residuos que rodean al hemo es muy similar para todas las 7PXs y la ZoPrx, independientemente de si comparten o no la misma carga, pero justo difiere considerablemente en la posición del residuo al final del canal de acceso al sustrato. Debido a la presencia de la Thr177, el área del acceso al canal en la ZoPrx es de $\sim 12 \text{ \AA}^2$ mientras que el área equivalente en la ATP A2 es de $\sim 4 \text{ \AA}^2$ (estimación realizada mediante el programa *MOLEOnline* versión 1.4 [Petrek *et al.*, 2007]); Este aumento de tres veces en la apertura del canal podría estar involucrada en la resistencia a altas concentraciones de H_2O_2 de la ZoPrx.

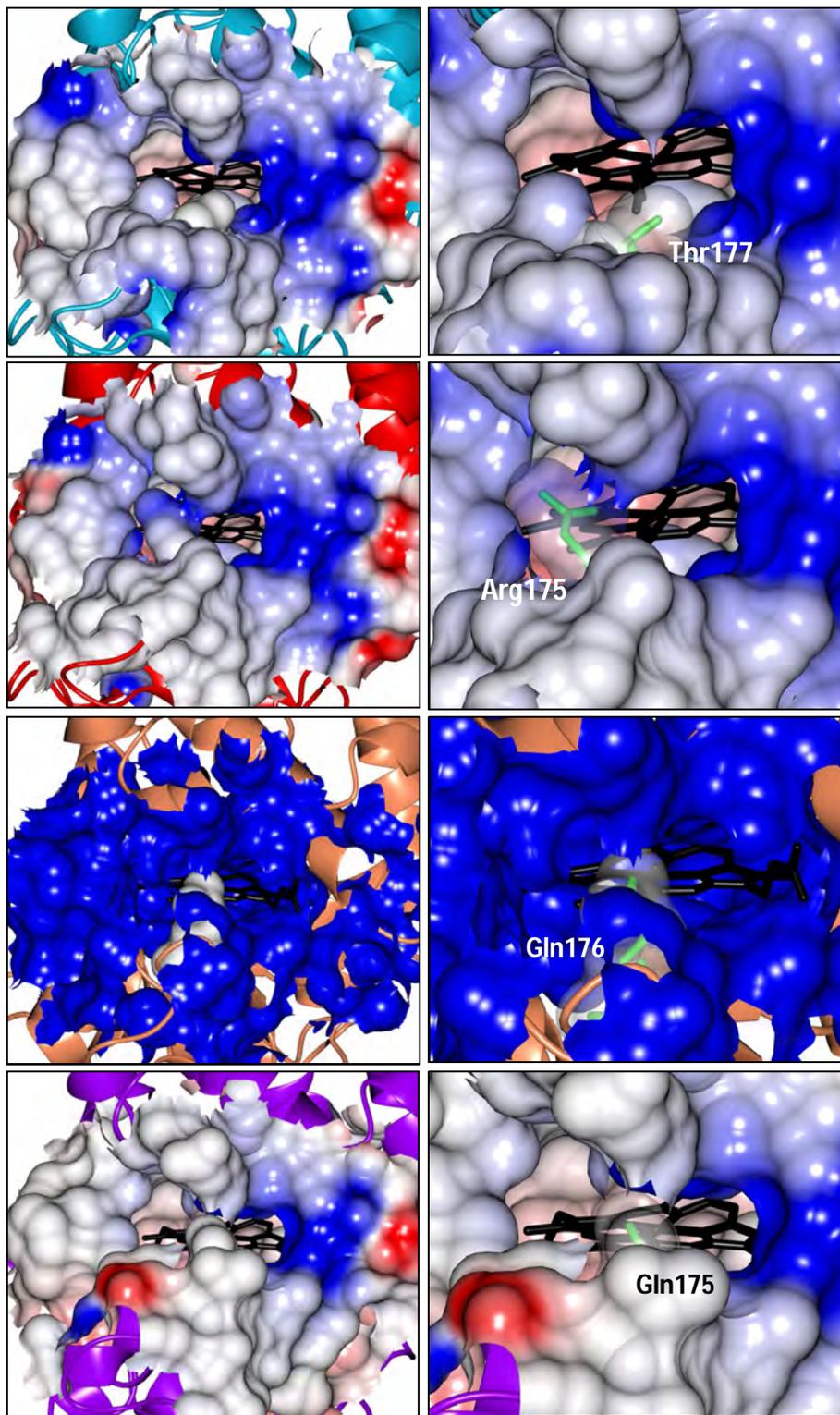


Figura 21. Representaciones de la superficie electrostática alrededor del hemo de la ZoPrx, la ATP A2, la HRPC y la PNP, orientada hacia el canal de acceso del sustrato hacia el hemo. (1) ZoPrx y un (2) acercamiento, donde se resalta la posición de la Thr177. (3) ATP A2 y un (4) acercamiento, donde se acentúa la posición de la Arg175. (5) HRPC y un (6) acercamiento, donde se observa la posición de la Gln176. (7) PNP y un (8) acercamiento, donde se recalca la posición de la Gln175. En las imágenes de la columna derecha, se transparentó la superficie electrostática de los residuos al final del canal de acceso del sustrato que se ubican justo al frente del borde δ -meso del hemo, y se resaltan en verde para observarlos mejor. Nótese que la superficie de la Arg175, la Gln176 y la Gln175 forman un bloqueo parcial de manera vertical en la cavidad donde se encuentra el hemo. Para las imágenes 5 y 6, aunque se puede observar el propionato del borde γ -meso, en realidad también está cubierto por los residuos que lo rodean. La superficie electrostática se colorea: de rojo cuando la carga del a.a es ≥ 1 V; de azul cuando es ≤ -1 V; Y en blanco cuando no presenta carga.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las hemo-peroxidasas han captado la atención de muchos investigadores alrededor del mundo, en especial, debido a su amplia distribución en los seres vivos, y por su gran variedad de papeles fisiológicos. Al día de hoy, la mayor limitante para su explotación ha sido lograr su alta expresión en sistemas recombinantes, y mejorar la estabilidad de estas enzimas. El hecho de que con los años aumente la disponibilidad de estructuras cristalográficas, en especial de las peroxidasas de la Clase III, es un paso hacia delante para que en un futuro no tan lejano se pueda entender el por qué de la alta ocurrencia de múltiples isoenzimas de peroxidasas y su significado fisiológico [Smith & Veitch, 1998]. El reto es saber explotar la nueva información estructural de manera que se puedan llegar a explicar las diferencias fisiológicas claves de los miembros de la Clase III de peroxidasas.

La Zo-peroxidasa fue aislada de las raíces del rábano japonés (*Raphanus sativus* L. Daikon); Su modelo cristalográfico final consta de una sola cadena polipeptídica de una glicoproteína con una masa molecular de aproximadamente 47 kDa constituida por 308 residuos de aminoácidos, y que incluye un hemo b como grupo prostético, dos iones de calcio, y cuatro puentes disulfuro. Además cada monómero de la ZoPrx contiene 7 sitios de *N*-glicosilación compuestos de 7 cadenas de oligosacáridos heterogéneas.

Ya que la ZoPrx representa tan solo el 1.5% de la actividad de peroxidasa en el extracto crudo, para purificar una cantidad significativa (>1 mg de proteína), se requiere de una gran cantidad de rábanos japoneses (50 kg para obtener ~1 mg) [Gil-Rodríguez & Valderrama, 2009], lo cual resultó en la gran limitación del número de ensayos para pruebas de cristalización. La obtención de la secuencia completa nos facilita la posibilidad de obtener mayor cantidad de esta enzima mediante tecnología de ADN recombinante, que teóricamente nos generaría una proteína activa y más fácil de cristalizar al no presentar glicosilaciones. Pero es necesario tomar en cuenta que la secuencia que se obtuvo puede no ser correcta en su totalidad; Para el modelaje de la estructura tridimensional de una proteína mediante cristalografía de Rayos-X, es crucial que se cuente con la secuencia de la proteína para saber cuáles son los residuos que deben ajustarse al mapa de densidad electrónica respectivo. En el caso de la ZoPrx, sólo se contaba con una secuencia parcial, por lo que la mayoría de su modelaje se hizo de acuerdo a la densidad electrónica obtenida. Pero ya que la resolución del mapa (2.05 Å) nos presenta cierta incertidumbre en la identidad de algunos residuos en el modelo, fue necesario hacer un consenso con las secuencias de enzimas homólogas para completar la

secuencia de la ZoPrx, por lo que no se puede confiar en que su secuencia final sea 100% fidedigna, es específico con los 24 residuos marcados en la fig. 10. Sin embargo, 284 de los 308 residuos de la ZoPrx fueron asignados con un sustento estructural inapelable.

La estructura tridimensional de la ZoPrx es similar a las estructuras previamente determinadas de las peroxidasas de plantas de Clase III ATP A2, HRPC, SBP, ATP N PNP, BP1 y RPTP. La comparación tanto de la secuencia como de la estructura de la ZoPrx con las 7PXs homólogas se realizó con la esperanza de encontrar algún cambio en la secuencia y/o estructura de la ZoPrx a la cual se pudiera atribuir la característica distintiva de esta POX, que es su gran estabilidad a concentraciones catalíticas de H₂O₂.

De acuerdo con su estructura cristalográfica, la ZoPrx presenta invariablemente, al igual que todas las peroxidasas de plantas, dos dominios estructurales diferentes, los cuales envuelven el grupo hemo b, el cual se ubica en una cavidad formada por dos α -hélices antiparalelas, la hélice B y la hélice F. La hélice F en el dominio II o contribuye con la histidina proximal (His171) conservada en todas las POXs, cuyo N_D está unido mediante un puente de H al grupo carboxilato de un asparato (Asp248) evolutivamente conservado. Mientras la hélice B en el dominio I forma la cavidad distal del sitio activo, y provee la His y Arg distales invariables (His44 y Arg40), que son cruciales para la escisión heterolítica del enlace peroxídico en el H₂O₂, y que se encuentran separadas por un residuo con una cadena lateral aromática, que en este caso es una fenilalanina (Phe43).

La región en la secuencia que varía más entre las peroxidasas es aquella entre las α -hélices F y G, donde se presenta una larga inserción que estará formando parte de las α -hélices adicionales F' y F'' en las POXs, si es que se presentan. En el modelo tridimensional de la ZoPrx se encontró que dicha región (llamada segunda zona de discrepancia) varía en posiciones entre las dos moléculas modeladas, y que además ésta misma región varía tanto en secuencia como en estructura (como era de esperarse según Welinder [1992], Veitch [2004] y Gajhede, *et al.* [1997]) al compararse con las 7PXs. En el caso de las discrepancias entre las dos moléculas modeladas (A y B) para la ZoPrx, esto puede ser atribuido a que dicha región podría presentar movilidad por lo que cristaliza en distintas posiciones para la mayoría de las moléculas de la enzima contenidas en el cristal, lo que conlleva a que no sea posible apreciar una densidad electrónica definida. En cuanto a la variación entre las secuencias para las diferentes homólogas, no se encontró ningún estudio previo en el cual se indicará que dicha zona en alguna de estas peroxidasas tenga algún tipo de dinamismo ni que dicha variabilidad influya de algún modo en la actividad y/o estabilidad oxidativa de esta clase (Clase III) de hemo-peroxidasas. Para investigar a mayor profundidad este respecto, se podrían realizar

estudios que permitieran evidenciar si es que existe o no un elemento de dinamismo en dicha región de variabilidad, tal vez mediante Dinámicas Moleculares y/o Resonancia Magnética Nuclear.

La ZoPrx y la ATP A2 comparten casi los mismos residuos en el canal de acceso del sustrato. Ambas proteínas carecen de las tres fenilalaninas características que le confieren un carácter hidrofóbico a la HRPC que sí las presenta (Phe68, Phe142, Phe179). De acuerdo con Østergaard *et al.* (2000), aunque la hidrofobicidad de los residuos que reemplazan estas fenilalaninas en la ATP A2 (y en la ZoPrx) en general se mantiene, la ausencia de los anillos aromáticos en el canal de acceso puede influenciar la habilidad de la ATP A2 (y por lo tanto de la ZoPrx) de liberar productos radicales aromáticos, lo cual reduce el riesgo de auto-oxidación. A pesar de los cambios en residuos entre la ZoPrx, la ATP A2, y las demás 7PXs, en general se mantiene el carácter hidrofóbico y sin carga del canal de acceso del sustrato, lo cual también es una característica de las POXs.

Para la ZoPrx, el cambio que se encontró más relevante en el canal de acceso del sustrato es una Thr(177), que se ubica justo en la desembocadura del canal frente al grupo hemo, formando solo un enlace de H con el propionato del lado δ -*meso* del grupo prostético, lo cual difiere en las 7PXs cuyos residuos en la posición equivalente forman dos puentes de H con el mismo propionato. La actividad catalítica de las hemo-PRXs está influenciada por la apropiada orientación del grupo hemo con respecto a los residuos distales His y Arg, la cual depende de las interacciones entre los propionatos del hemo y los residuos adyacentes de la proteína. Es por esto que los propionatos del hemo poseen un papel importante en la estabilidad de la cavidad del sitio activo y en la formación de los intermediarios catalíticos [Watanabe *et al.*, 2010]. Es más, varios estudios indican que los grupos propionatos actúan no sólo como un punto de anclaje electrostático para que el hemo se enlace y oriente correctamente con la cadena polipeptídica, pero que también influyen sus propiedades electrónicas [Poulos, 2010]. Guallar y Olsen [2006] sugieren que los propionatos participan en la transferencia electrónica del H₂O₂ al hierro; El mecanismo para la transferencia de electrones es un balance delicado entre los pares no apareados en los orbitales de los propionatos y el sistema porfirina π , por lo que se espera que la topología de la enzima afecte (activando/desactivando) este balance. Por lo que el cambio en la interacción del propionato y la proteína mediado por la Thr177 podría influenciar en alguna medida las propiedades catalíticas de la enzima y en consecuencia esto se vea relacionado con la resistencia que exhibe la ZoPrx a la inactivación por H₂O₂. Además, a diferencia de las 7PXs que presentan residuos con una cadena lateral más larga en la misma posición, esta Thr (en la ZoPrx) no forma un bloqueo parcial vertical en el acceso al hemo. Antes de afirmar si estas características son las responsables (parcialmente al menos) o no de la gran resistencia de la ZoPrx a la inactivación por H₂O₂, sería prudente realizar un

experimento de clonación con mutagénesis sitio-dirigida, mutando esa Thr en particular tal vez por una Arg (como en la ATP A2) y realizar ensayos de actividad y más importante, de estabilidad oxidativa al H₂O₂.

El grado de conservación estructural de los sitios de los cationes entre la ZoPrx y las 7PRXs es claro. En la ZoPrx, el Ca²⁺ proximal y el Ca²⁺ distal están a 13.4 Å y 15.7 Å del hierro, respectivamente, mientras que la distancia entre ambos calcioes es de 26.7 Å. Las distancias correspondientes para la ATP A2 son 13.4 Å, 15.7 Å y 26.65 Å y para la PNP 13.3 Å, 15.7 Å y 26.5 Å, respectivamente. Además la conformación de las cadenas de C α alrededor de ambos iones Ca²⁺ está bastante conservado en las 7PXs y la ZoPrx.

Un ejemplo de daño específico causado por la radiación ionizante de los Rayos-X es la disrupción del enlace entre los grupos tiol de las cisteínas (puentes disulfuro) [Ravelli & McSweeney, 2000]. El hecho de que la densidad electrónica alrededor de todos los puentes disulfuro no esté bien definida (deterioro del mapa $2F_o-F_c$) sugiere que las cisteínas sufrieron daño por radiación durante la colecta de datos. Este daño se manifiesta cuando los enlaces S_G-S_G se alargan y por lo tanto aparecen nuevos rotámeros de Cys [Petrova *et al.*, 2010]. Sin embargo, como se puede observar en la fig. 13 los residuos de Cys no exhiben el mismo grado de deterioro, peculiaridad común en proteínas con varios puentes disulfuro [Ravelli & McSweeney, 2000]. Siguiendo la idea, una observación común es que la susceptibilidad al daño inducido por la radiación de los puentes disulfuro está directamente relacionada con la accesibilidad al solvente [Weik *et al.*, 2000]. Lo que llama la atención en el caso de los puentes disulfuro en la ZoPrx, es que los puentes SS-2 (Cys46-Cys51) y SS-3 (Cys99-Cys301) que se encuentran protegidos del contacto directo al solvente también presentan daño, en particular el SS-3 (ver fig. 13c) que es el único que muestra rotámeros con tioles tan reducidos que no pueden formar un enlace. Mientras que para el SS-2, aunque es el único que no forma rotámeros, posiblemente debido a que como sus átomos vecinos están "empaquetados" muy cercanamente lo que hace que nuevos conformeros sean energéticamente desfavorables, sí se observa densidad negativa (mapa F_o-F_c negativo a 3.5 σ , ver fig. 13b) lo que nos indica que este puente no está bien definido en todas las copias de la ZoPrx dentro del cristal.

Se ha notado que las glicosilaciones en proteínas les confieren mayor solubilidad y resistencia a la proteólisis. También se ha probado que tanto ambos iones Ca²⁺, como los *N*-glicanos en PRXs, influyen la estabilidad de estas proteínas, no obstante el papel de los oligosacáridos en el control del patrón de plegamiento sigue siendo elusivo en contraste con el papel estructural de los iones calcio que ya ha sido ampliamente explorado. Profundizar en este tema se ha visto

obstaculizado, debido en gran medida, a que muy pocas estructuras cristalográficas de glicoproteínas muestran glicanos en sus mapas de densidad electrónica debido a las dificultades inherentes de la cristalización de proteínas nativamente glicosiladas; La flexibilidad y heterogeneidad de las cadenas de oligosacáridos obstaculizan el crecimiento de los cristales. Y a pesar de esto, en el presente trabajo fue posible cristalizar la forma nativa altamente glicosilada de la ZoPrx, pero entonces, ¿cómo lo podemos explicar? Creemos que las condiciones empleadas para la cristalización de la ZoPrx purificada empleada fueron fortuitamente más propicias.

8. CONCLUSIÓN

La Zo-Peroxidasa es una glicoproteína monomérica que consta de 308 residuos de aminoácidos y que presenta las características estructurales distintivas de la Clase III de la súper-familia de peroxidases-catalasas, tales como la presencia de una ferriprotoporfirina IX en su sitio activo, dos sitios de unión para iones calcio, cuatro puentes disulfuro y un puente salino, todos estos formados por residuos altamente conservados dentro de la súper-familia.

En el estudio del modelo cristalográfico de la ZoPrx no se encontró ninguna diferencia estructural en el sitio activo ni en el empaquetamiento interno de la enzima –aparte de la apertura en la desembocadura del canal de acceso al hemo– a la cual pudiera atribuirse total o parcialmente la mayor resistencia a la inactivación por H_2O_2 que posee ésta enzima, por lo que se alza la posibilidad de que la presencia de la Thr177, que es el residuo causante de que haya una mayor apertura al final del canal de acceso del sustrato en la ZoPrx (al menos 3 veces más grande en comparación con el de la ATP A2) y de que el O_{2A} del propionato del lado δ -meso del grupo prostético sólo esté formando un enlace de H con dicho residuo (interacción que es doble para los demás residuos en la misma posición en las enzimas homólogas con estructura determinada), esté relacionada en alguna medida con la gran estabilidad oxidativa que exhibe esta hemo-peroxidasa.

9. PERSPECTIVAS

La determinación de las estructuras tridimensionales forman las bases para un entendimiento detallado de las propiedades catalíticas de las enzimas [Gajhede, 2001].

Las peroxidases de plantas se describen frecuentemente como enzimas que poseen una amplia especificidad de sustratos, debido principalmente al relativamente pequeño número de restricciones que limitan la elección de un sustrato reductor, en particular, relacionado directamente con el poder oxidativo de los Compuestos I y II y a la accesibilidad del sitio de interacción proteína-sustrato. Sin embargo, se han demostrado ciertas preferencias a la unión con sustratos [Veitch, 2004] que se originan por propiedades estructurales. La disponibilidad de modelos estructurales de los intermediarios catalíticos o complejos con sustratos nos provee de un marco de trabajo bajo el cual podríamos distinguir propiedades estructurales críticas, tales como la

diferencia estructural que se presenta al final del canal de acceso del sustrato por la Thr177 en la ZoPrx. Como en el caso de muchos trabajos realizados con la HRPC (p.e. en Newmyer y Ortiz de Montellano, 1995), se podría realizar mutagénesis sitio-dirigida en la ZoPrx para explorar y tal vez llegar a determinar el papel del residuo de Thr177 y de otros residuos del canal de acceso del sustrato en particular, que podrían causar una especificidad de sustrato más marcada. Lo que se necesita hacer a futuro para desarrollar este aspecto en mayor detalle es una investigación más profunda de la relación entre la unión del sustrato y su oxidación en el sitio activo, lo cual podríamos explorar mediante la cristalización y determinación estructural de la ZoPrx en un estado de oxidación diferente al basal, en especial el Compuesto III y en complejo con un sustrato reductor.

Ahora que ya disponemos de la secuencia completa de la ZoPrx, es viable que se logre clonar y expresar por medio de tecnología de ADN recombinante, posiblemente con los sistemas empleados para otras PRXs, que emplean principalmente a *Escherichia coli* como sistema de expresión. Su producción a mayor escala es crucial para realizar muchas más pruebas de cristalización donde la ZoPrx se encuentre en diferentes estados y en complejo con un sustrato, y/o en presencia de H₂O₂.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, B. & Torres, E. (2009). Recent patents in the use of peroxidases. *Recent Patents in Biotechnology*, 3(2), 88-102.
- Ayala, M. & Torres, E. (2010) Chapter 1, Introduction. En M. Ayala & E. Torres (Eds.) *Biocatalysis based on Heme Peroxidases: Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts*. (pp. 1-4) Springer, EE.UU., 358 p.
- Baek, H.K. & Van Wart, H.E. (1989). Elementary steps in the formation of horseradish peroxidase Compound I: Direct observation of Compound 0, a new intermediate with a hyperporphyrin spectrum. *Biochemistry*, 28, 5714-5719.
- Banci, L. (1997). Structural properties of peroxidases. *Journal of biotechnology*, 53(2-3), 253-63.
- Barr, D.P. & Aust, S.D. (1994) Conversion of lignin peroxidase compound III to active enzyme by cation radicals, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 312, 511-515.
- Battistuzzi, G., Bellei, M., Bortolotti, C. A. & Sola, M. (2010). Redox properties of heme peroxidases. *Archives of biochemistry and biophysics*, 500(1), 21-36.
- Bohinski, R.C. (1991). Capítulo 5, Enzimas. En R.E. Mata (Trad.) *Bioquímica*. (pp. 173-225) Addison-Wesley Iberoamericana, EE.UU. 739p.
- Bohne-Lang, A. & von der Lieth, C.W. (2005) □GlyProt: in silico glycosylation of proteins. □*Nucleic Acids Research*, 33, W214-219.
- Brown, N.P., Leroy C. & Sander C. (1998). MView: A Web compatible database search or multiple alignment viewer. *Bioinformatics*, 14(4), 380-381.
- Dunford, H.B. (1999). *Heme Peroxidases*. Wiley, EE.UU. 507 p.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallographica*, 66(4), 486-501.
- Gajhede, M. (2001). Plant peroxidases: substrate complexes with mechanistic implications. *Biochemical Society Transactions*, 29(2), 91-99.
- Gajhede, M, Schuller, D.J., Henriksen, A, Smith, A.T., Poulos, T.L. (1997). Crystal structure of HRP C at 2.5 Å resolution. *Nature Structural Biology*, 4(12), 1032-1038.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D. & Bairoch A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. □ En Walker, J.M. (Ed), *The Proteomics Protocols Handbook*, (pp. 571-607). Humana Press. □

- Gil-Rodríguez, P.C. (2006). Zo Peroxidasa: Mecanismo de reacción de una peroxidasa intrínsecamente estable al peróxido de hidrógeno. Tesis (Maestría en Ciencias). UNAM, Instituto de Biotecnología, Depto. de Medicina Molecular y Bioprocesos, México. 63p.
- Gil-Rodríguez, P. & Valderrama B. (2009). An optimized procedure for the purification of Zo peroxidase (ZoPrx), a low abundance peroxidase from Japanese radish roots. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 1(2), 9-12.
- Gil-Rodríguez, P., Ferreira-Batista, C., Vázquez-Duhalt, R. & Valderrama B. (2008). A novel heme peroxidase from *Raphanus sativus* intrinsically resistant to hydrogen peroxide. *Engineering in Life Science*, 8(3), 286-296.
- Guallar, V. & Olsen, B. (2006). The role of the heme propionates in heme biochemistry. *Journal of inorganic biochemistry*, 100(4), 755-60. doi:10.1016/j.jinorgbio.2006.01.019
- Habeta, M. & Bosch, T.C. (2005) Symbiotic Hydra express a plant-like peroxidase gene during oogenesis. *Journal of Experimental Biology*, 208, 2157-2165.
- Henriksen, A., Mirza, O., Indiani, C., Teilum, K., Smulevich, G., Welinder, K. G. & Gajhede, M. (2001). Structure of soybean seed coat peroxidase : A plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. *Protein Science*, 10, 108-115.
- Henriksen, A., Welinder, K.G. & Gajhede, M. (1998). Structure of Barley Grain Peroxidase Refined at 1.9-Å Resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 273(4), 2241-2248.
- Hiner, A., Hernández, J., Rodríguez, J.N., Arnao, M.B., García, F. & Acosta, M. (2002). Plant peroxidases from 3 classes share similar mechanisms of inactivation with peroxide. En M. Acosta, J.N. Rodríguez-López, M.A. Pedreño (Eds.), *Plant peroxidases: biochemistry and physiology*; VI International Plant Peroxidase Symposium proceedings (pp. 92-96). Universidad de Murcia, Murcia, España, 307 p.
- Holm, L., & Sander, C. (1996). The FSSP database: fold classification based on structure – structure alignment of proteins. *Molecular Biology*, 24(1), 206-209.
- Kunishima, N., Fukuyama, K., Matsubara, H., Hatanaka, H., Shibano, Y. & Amacho, T. (1994). Crystal structure of the fungal peroxidase from *Arthromyces ramosus* at 1.9 Å resolution. Structural comparisons with the lignin and cytochrome c peroxidases. *Journal of Molecular Biology*, 235(1), 331-344.
- Laberge, M., Huang, Q., Schweitzer-Stenner, R. & Fidy, J. (2003). The endogenous calcium ions of horseradish peroxidase C are required to maintain the functional nonplanarity of the heme. *Biophysical journal*, 84(4), 2542-52.
- Lütke, T., Frank, M. & von der Lieth, C.W. (2005). Carbohydrate Structure Suite (CSS): analysis of carbohydrate 3D structures derived from the PDB. *Nucleic acids research*, 33, D242-D246.
- Madden, T. (2002). Chapter 16, The BLAST Sequence Analysis Tool. [Actualizado el 13/Ago/2003]. En: McEntyre, J., Ostell, J., (Eds.), *The NCBI Handbook* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information.

- McNicholas, S., Potterton, E., Wilson, K.S. & Noble, M.E.M. (2011). Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 67(Pt 4), 386-94.
- Morita, Y., Yoshida, C. & Maeda, Y. (1971). Properties and structure of peroxidase isoenzymes of Japanese-radish. *Agricultural and Biological Chemistry*, 35(7), 1074-1083.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J. (1997). Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Crystallographica*, D53, 240-255.
- 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.pdf. *Journal of Biological Chemistry*, 270(33), 19430-19438.
- Nielsen, L., Indiani, C., Henriksen, A., Feis, A., Becucci, M., Gajhede, M., Smulevich, G., *et al.* (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(10), 11013-11021.
- Mirza, O. & Welinder, K. G. (2000). Arabidopsis thaliana peroxidase N: structure of a novel neutral peroxidase. *Acta Crystallographica Section D*, D56, 372-375.
- Ortiz de Montellano, P.R. (2010). Chapter 5, Catalytic mechanisms of heme peroxidases. En: Ayala, M. & Torres, E. (Eds.), *Biocatalysis based on Heme Peroxidases: Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts*. (pp. 79-107) Springer, EE.UU., 358 p.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. En: Carter, C.W. & Sweet, R.M. (Eds.), *Methods in Enzymology*, Volumen 276: Macromolecular Crystallography, parte A, (pp.307-326). Academic Press, N.Y., EE.UU.
- Østergaard, L., Teilum, K., Mirza, O., Mattsson, O., Petersen, M., Welinder, K. G., Mundy, J., *et al.* (2000). Arabidopsis ATP A2 peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification. *Plant molecular biology*, 44(2), 231-43.
- Paoli, M., Marles-Wright, J. & Smith, A. (2002). Structure-function relationships in heme-proteins. *DNA and Cell Biology*, 21, 271-280.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C. & Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24, 255-265.
- Petrek M., Kosinova P., Koca J. & Otyepka M. (2007). MOLE: A Voronoi Diagram-Based Explorer of Molecular Channels, Pores, and Tunnels. *Structure*, 15, 1357-1363.
- Petrova, T., Ginell, S., Mitschler, A., Kim, Y., Lunin, V.Y., Joachimiak, G., Cousido-Siah, A., *et al.* (2010). X-ray-induced deterioration of disulfide bridges at atomic resolution. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 66(10), 1075-91.
- Poulos, T.L. (2010). Thirty years of heme peroxidase structural biology. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500(1), 3-12.

- Poulos, T.L. & Kraut, J. (1980). The stereochemistry of peroxidase catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 255, 8199-8205.
- Poulos, T.L., Freer, S. T., Alden, R. a, Edwards, S. L., Skogland, U., Takio, K., Eriksson, B., *et al.* (1980). The crystal structure of cytochrome c peroxidase. *The Journal of biological chemistry*, 255(2), 575-80.
- Ravelli, R. B., & McSweeney, S. M. (2000). The “fingerprint” that X-rays can leave on structures. *Structure*, 8(3), 315-28.
- Ruiz-Dueñas, F. & Martínez, A.T. (2010). Chapter 3, Structural and functional features of peroxidases with potential as industrial biocatalysts. En: Ayala, M. & Torres, E. (Eds.) *Biocatalysis based on Heme Peroxidases: Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts*. (pp. 37-59) Springer, EE.UU., 358 p.
- Schoemaker, H.E., Lundell, T.K., Hatakka, A.I. & Piontek, K. (1994). The oxidation of veratryl alcohol, dimeric lignin models and lignin by lignin peroxidase: The redox cycle revisited. *FEMS Microbiology Reviews*, 13, 321-331.
- Schuller, D. J., Ban, N., Huystee, R.B.V., Mcpherson, A., & Poulos, T.L. (1996). The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure*, 4(3) 311-321.
- Smith, A.T. & Veitch, N.C. (1998). Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. *Current opinion in chemical biology*, 2(2), 269-78.
- Tams, J. W. & Welinder, K. G. (1995). Mild chemical deglycosylation of horseradish peroxidase yields a fully active, homogeneous enzyme. *Analytical biochemistry*, 228, 48-55.
- Vagin, A.A. & Teplyakov, A.(1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement. *Journal of applied crystallography*. 30, 1022-1025.
- Valderrama, B. (2010) Chapter 11, Deactivation of Hemeperoxidases by Hydrogen Peroxide: Focus on Compound III. En M. Ayala & E. Torres (Eds.) *Biocatalysis based on Heme Peroxidases: Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts*. (pp. 291-314) Springer, EE.UU., 358 p.
- Valderrama, B., Ayala, M., & Vazquez-Duhalt, R. (2002). Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chemistry & biology*, 9(5), 555-65.
- Valerio, L., De Meyer, M., Penel, C., & Dunand, C. (2004). Expression analysis of the Arabidopsis peroxidase multigenic family. *Phytochemistry*, 65(10), 1331-42.
- van Huystee, R.B., Sun, Y. & Lige, B. (2002). A retrospective look at the cationic peanut peroxidase structure. *Critical reviews in biotechnology*, 22(4), 335-54.
- Veitch, N. C. (2004). Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochemistry Reviews*, 3, 3-18.
- Wallace, A.C., Laskowski, R.A. & Thornton, J.M. (1996). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering*. 8, 127-134.

- Watanabe, L., Ribeiro, P., Moura, D., Bleicher, L., Nascimento, A. S., Zamorano, L.S., Calvete, J. J., *et al.* (2010). Crystal structure and statistical coupling analysis of highly glycosylated peroxidase from royal palm tree (*Roystonea regia*). *Journal of Structural Biology*, 169(2), 226-242.
- Weik, M., Ravelli, R.B., Kryger, G., McSweeney, S., Raves, M.L., Harel, M., Gros, P., *et al.* (2000). Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), 623-8.
- Welinder, K.G. (1979). Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. *European Journal of Biochemistry*, 502, 483-502.
- Welinder, K.G. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Biology*, 388, 388-393.
- Welinder, K.G. & Gajhede, M. (1993). Structure and evolution of peroxidases. En: Greppin, H., Rasmussen, S.K., Welinder, K.G. and Penel, C. (Eds.), *Plant peroxidases: biochemistry and physiology; III International Plant Peroxidase Symposium proceedings* (pp. 35-42). University of Copenhagen and University of Geneva, Geneva, 497 p.
- Welinder, K.G. & Larsen, Y.B. (2004). Covalent structure of soybean seed coat peroxidase. *Biochimica et biophysica acta*, 1698(1), 121-6.
- Wormald, M. R., & Dwek, R. A. (1999). Glycoproteins : glycan presentation and protein-fold stability
Glycosylation of proteins has been shown to play a role in a. *Structure*, 7(7), 155-160.
- Yonetani, T. (1976). Cytochrome C Peroxidase. En P.D. Boyer (Ed.), *The Enzymes*, Academic Press, 13, 345-361.
- Zamocky, M., Jakopitsch, C., Furtmüller, P. G., Dunand, C., & Obinger, C. (2008). The peroxidase-cyclooxygenase superfamily: Reconstructed evolution of critical enzymes of the innate immune system. *Proteins*, 72(2), 589-605.
- Zamocky, M. & Obinger, C. (2010) Chapter 2, Molecular phylogeny of heme peroxidases. En M. Ayala & E. Torres (Eds.) *Biocatalysis based on Heme Peroxidases: Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts*. (pp. 7-35) Springer, EE.UU., 358 p.