



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE METALOPROTEÍNAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

RODOLFO GUILLERMO VALLE ALTAMIRANO

TUTORA

DRA. BRENDA VALDERRAMA BLANCO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas

COMITÉ TUTOR

Dra. Noráh Yolanda Barba Behrens

Dra. Adela Rodríguez Romero

Dra. Ana María Martínez Vázquez

Dra. Marcela Ayala Aceves

Dr. Iván Castillo Pérez

Facultad de Química, UNAM

Instituto de Química, UNAM

**Instituto de Investigación en
Materiales, UNAM**

**Programa de Maestría y Doctorado en
Ciencias Químicas**

Instituto de Química, UNAM

MÉXICO D.F., OCTUBRE 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 8 del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en el departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, bajo la asesoría de la Dra. Ma. Brenda Valderrama Blanco.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Biotecnología y al Posgrado en Ciencias Químicas.

A la Dra. Brenda Valderrama Blanco por la confianza y el apoyo brindado en el transcurso de la maestría.

Este proyecto se realizó con el apoyo de los proyectos DGAPA-UNAM IN-213010 y SEP-Conacyt 128156.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada No.476177.

Al Departamento de Biotecnología, Química y Farmacia de la Universidad Siena, a la Dra. Rebecca Pogni, a la Dra. Camilla Barato y a la M. en C. Martina Pagliaccia por el apoyo con los experimentos de EPR.

Al jurado por contribuir a la mejora de este escrito con sus comentarios y consejos.

Al Dr. Enrique Rudiño y a su grupo por el apoyo durante la estancia en el laboratorio.

Al M. en C. Raunel Tinoco V. y a la Biol. Sonia Rojas por el apoyo técnico durante el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros y amigos, la Dra. Georgina Hernández, al M. en C. Francisco Gasteazoro.

A mi familia y a mis amigos de la vida, por el apoyo incondicional y los consejos siempre oportunos.

A mis padres, Alberta Altamirano y Guillermo Valle, a mi hermana Magali Valle y especialmente a mi hermana Yuridia Valle, por darme el ejemplo más grande de valentía y fortaleza.

ÍNDICE	PÁGINA
<u>RESUMEN</u>	<u>1</u>
<u>INTRODUCCIÓN</u>	<u>3</u>
EL HIERRO EN LAS PROTEÍNAS	3
TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS EN METALOPROTEÍNAS	5
HEMOPROTEÍNAS	8
HEMOPEROXIDASAS	12
MECANISMO DE LAS HEMOPEROXIDASAS	19
COMPUESTOS I Y II	20
SUSTRATO REDUCTOR	25
COMPUESTO III	25
VÍAS DE DECAIMIENTO DEL COMPUESTO III	26
<u>ANTECEDENTES</u>	<u>28</u>
<u>HIPÓTESIS</u>	<u>33</u>
<u>OBJETIVOS:</u>	<u>33</u>
<u>METODOLOGÍA:</u>	<u>34</u>
PURIFICACIÓN	34
ESTABILIDAD DE ZOPRX ANTE H ₂ O ₂	35
CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA	36
PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA CARACTERIZACIÓN DE ZOPRX POR EPR	36
<u>RESULTADOS</u>	<u>38</u>
PURIFICACIÓN	38
CARACTERIZACIÓN POR EPR DE LA ZOPRX	39
EXPERIMENTOS CON H ₂ O ₂	39
EXPERIMENTOS DE REACCIONES INCUBADAS POR 72 HORAS	42
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>43</u>

<u>CONCLUSIONES</u>	<u>50</u>
<u>PERSPECTIVAS</u>	<u>50</u>
<u>ANEXO</u>	<u>52</u>
EXPERIMENTOS DE REACCIONES CON SUSTRATO REDUCTOR	52
<u>REFERENCIAS</u>	<u>55</u>

ABREVIATURAS

Å	Angstrom
ABTS	2,2,-azinobis (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato)
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
ATP53	Peroxidasa de berro isoenzima 53
AtPA2	Peroxidasa de berro isoenzima A2
AtPN	Peroxidasa de berro isoenzima N
CM	Carboximetil celulosa
Cys	Cisteína
EPR	Resonancia paramagnética electrónica
EXAFS	Espectroscopía extendida de estructura fina por absorción de rayos X
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
His	Histidina
HRPA2	Peroxidasa de rábano picante isoenzima A2
HRPC	Peroxidasa de rábano picante isoenzima C
HRPE5	Peroxidasa de rábano picante isoenzima E5
HSAB	Principio de ácidos y bases duros y blandos
LiP	Lignina peroxidasa
Lys	Lisina
Met	Metionina
MnP	Manganeso peroxidasa
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
Phe	Fenilalanina
PNP	Peroxidasa de Maní
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S	Espín
SBP	Peroxidasa de soya

SDS	Dodecil sulfato sódico
BPS	Buffer fosfatos de sodio
Tyr	Tirosina
ZoPrx	Zo Peroxidasas

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de posibles estados de alto y bajo espín del hemo para d^5 y d^6 .	4
Figura 2. Forma de las señales de los espectros en EPR según la geometría.	7
Figura 3. Esquema de los diferentes grupos hemo.	10
Figura 4. Diagrama de la variación de estabilidad de los estados de espín (S) del Fe(III) hémico respecto a fuerza del campo que ejerce el quinto y sexto ligante.	11
Figura 5. Hemoproteínas y sus funciones bioquímicas.	12
Figura 6. Representación tridimensional de los sitios distal y proximal conservados en las hemoperoxidasas.	13
Figura 7. Esquema de las estructuras de las hemoperoxidasas.	13
Figura 8. Estructura tridimensional de HRPC.	14
Figura 9. Coordinación de hierro hémico de peroxidasa.	15
Figura 10. Red de puentes de hidrógeno alrededor del hemo en LiP.	16
Figura 11. Sitios de unión del calcio distal y proximal de HRPC.	17
Figura 12. Disminución de la banda Soret de una peroxidasa variante de <i>Bjerkandera adusta</i> carente de Ca^{2+} incubada en presencia de 1 mM de H_2O_2 .	17
Figura 13. N-glicosilaciones presentes en la ZoPrx.	18
Figura 14. Mecanismo de ciclo catalítico de las hemoperoxidasas.	20
Figura 15. Residuos de aminoácidos en la cavidad hemo de una peroxidasa típica de plantas (peroxidasa de cacahuete).	21
Figura 16. Formación del compuesto I de HRPC.	23
Figura 17. Mecanismo de reducción del compuesto I, compuesto II y oxidación del sustrato.	24
Figura 18. Mecanismo propuesto de inactivación por H_2O_2 de la Zo peroxidasa.	27
Figura 19. Cinética de inactivación de ZoPrx (Δ), HRPA2 (o) incubando con 1 mM de H_2O_2 en ausencia de sustrato reductor en buffer fosfato pH 6.1 60 mM.	29
Figura 20. Monitoreo del espectro de la banda Soret de a) HRPA2, b) ZoPrx con 1 mM de H_2O_2 .	30
Figura 21. Monitoreo del espectro del ciclo catalítico de a) HRPA2, b) ZoPrx.	30
Figura 22. Secuencia completa de la ZoPrx.	32
Figura 23. Banda Soret ZoPrx.	38

Figura 24. Electroforesis en gel de la ZoPrx.	39
Figura 25. Espectro de EPR a 5K de la ZoPrx, especie nativa.	39
Figura 26. Espectro de EPR a 4K de la en reacción 1:1 ZoPrx:H ₂ O ₂ .	40
Figura 27. Espectro de EPR a 4 K del compuesto I formado en la reacción 1:8 ZoPrx:H ₂ O ₂ .	40
Figura 28. Espectro de EPR a 4 K en la reacción 1:10,000 ZoPrx:H ₂ O ₂ .	41
Figura 29. Espectro de EPR a 18 K de la ZoPrx en presencia de peróxido de hidrógeno en relación 1:10,000 registrado después de 72 horas.	42
Figura 30. Espectro de EPR a 5K de la ZoPrx, especie nativa.	44
Figura 31. Espectro de EPR de la peroxidasa nativa de cebada (BP1) 100 μM a 10 K pH 4.0 y 6.5.	44
Figura 32. Espectro de EPR a 5 K de la ZoPrx nativa y a 4 K de la relación 1:8 ZoPrx:H ₂ O ₂ .	45
Figura 33. Espectro de EPR del compuesto I de APX 0.16 mM a 7.5 K pH 7.	45
Figura 34. Espectro de EPR HRP A2 0.2 mM pH 6.1 a 4 K.	46
Figura 35. Espectro de EPR a 4 K de las relaciones 1:8 y 1:10,000 ZoPrx:H ₂ O ₂ .	47
Figura 36. Espectro de EPR a 5 K de la ZoPrx nativa y a 4 K de la relación 1:10,000 enzima:H ₂ O ₂ .	48
Figura 37. Espectro de EPR de la reacción 1:10,000 después de 72 horas a 18 K.	48
Figura 38. Espectro de EPR a 17 K de la ZoPrx en presencia de peróxido de hidrógeno 1:100 registrado luego de 72 h.	49
Figura 39. Espectro de EPR a 70 K de la ZoPrx en presencia de peróxido de hidrógeno en relación enzima:peróxido:guayacol 1:8:300.	52
Figura 40. Espectro de EPR a 70 K de la ZoPrx en presencia de peróxido de hidrógeno en relación enzima:peróxido:p-cresol 1:8:300.	53
Figura 41. Espectro de EPR a 70 K de la ZoPrx en presencia de peróxido de hidrógeno en relación enzima:peróxido:p-cresol 1:10,000:300.	54
Figura 42. Espectro de EPR a 70 K de la ZoPrx en presencia de peróxido de hidrógeno en relación enzima:peróxido:p-cresol 1:8:300 y 1:10,000:300.	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos de las estructuras tridimensionales de peroxidasas de plantas determinadas por cristalografía de rayos X.	21
Tabla 2. Resumen de preparaciones para caracterización por EPR.	37
Tabla 3. Resumen de preparaciones para caracterización por EPR en presencia de sustrato reductor.	52

RESUMEN

Las hemoperoxidasas catalizan reacciones de epoxidación y oxidación de heteroátomos así como deshidrogenación y polimerización de compuestos aromáticos. Tienen aplicación potencial como biosensores, en inmunoensayos y en procesos industriales. Sin embargo, los usos comerciales de las hemoperoxidasas se han visto limitados por su baja estabilidad en presencia de su sustrato natural, H_2O_2 . La característica común de las hemoperoxidasas es que su sitio activo contiene un grupo prostético hemo consistente en 4 anillos pirrol sustituidos, puenteados por meteno y coordinados a un centro metálico de Fe. El estado basal del Fe en los grupos hemo es Fe^{III} o Fe^{II} dependiendo de la proteína; sin embargo, el metal transita por al menos cinco diferentes estados de oxidación dependiendo del mecanismo catalítico.

Las peroxidasas en su estado basal (Fe^{III}) utilizan H_2O_2 como aceptor de electrones para catalizar una variedad de reacciones de oxidación a través de un ciclo catalítico que involucra dos intermediarios, conocidos como compuestos I y II. El compuesto I es una oxoferril porfirina con un radical libre π catiónico asociado ($^{+\cdot}$ porfirina $\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}$). El radical libre se rescata con un electrón del sustrato reductor dando lugar al compuesto II, el cual es una oxoferril porfirina ($\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}$). El compuesto II es reducido por una segunda molécula de sustrato para regresar el sitio activo a su estado basal (Fe^{III}), completando un ciclo catalítico.

Sin embargo; en todas las hemoperoxidasas este ciclo catalítico se ve interrumpido por la desactivación de la enzima, misma que se presenta en altas concentraciones de H_2O_2 . Específicamente, el compuesto II reacciona con el exceso de H_2O_2 formando el compuesto III, un radical peroxil ferril porfirina ($^{\cdot}\text{OO}-\text{Fe}^{\text{III}}$).

En el laboratorio se realizó previamente la identificación, purificación y caracterización bioquímica la enzima Zo Peroxidasa (ZoPrx) a partir de raíces de rábano japonés (*Raphanus sativus* variedad Daikon). En este trabajo, se presenta la identificación y caracterización por EPR de un compuesto intermediario con características espectroscópicas (en EPR) distintas al compuesto III, compuesto formado bajo las mismas condiciones por las hemoperoxidasas. Éste restablece el estado basal de la proteína como una de sus vías de decaimiento, lo cual fue comprobado aún cuando después de haber sido

almacenada en presencia de exceso de peróxido de hidrógeno por 3 días a 4 °C, presentó actividad ante la adición de peróxido de hidrógeno.

INTRODUCCIÓN

El hierro en las proteínas

El hierro, elemento 26 en la tabla periódica, es el segundo metal más abundante (sólo después del aluminio) y el cuarto elemento más abundante de la corteza terrestre. Debido a su posición en los metales de la primera serie de transición, posee la propiedad de tener sólo parcialmente llenos sus orbitales d lo que le da al hierro la posibilidad de tener un gran número de estados de oxidación (desde $-II$ hasta $+VI$), siendo los principales el II (d^6) y III (d^5); sin embargo, se han observado los estados de oxidación de $Fe(IV)$ y $Fe(V)$, por ejemplo, como intermediarios durante el ciclo catalítico de las monooxigenasas¹ y $Fe(IV)$ en el ciclo catalítico de las peroxidasas².

El hierro(III) con una carga $+3$, es un ácido duro, por lo que prefiere unirse a ligantes duros oxigenados como fenolatos o carboxilatos antes que a ligantes como imidazoles o tiolatos, mientras que el hierro(II) con una carga $+2$, se encuentra en la frontera entre un ácido duro y uno blando, por lo que preferirá ligantes con azufre y/o nitrógeno donadores, tales como imidazoles o pirroles y ligantes con azufre como tiolatos o la metionina¹.

El número de coordinación más común en los que se encuentran el $Fe(II)$ y el $Fe(III)$ es seis, adquiriendo una geometría octaédrica, aunque también se observan complejos con números de coordinación 4 (tetraédricos) y en casos particulares, complejos con números de coordinación 5 con geometrías bipirámide trigonal o pirámide de base cuadrada. Para complejos octaédricos, pueden observarse dos estados de espín¹. En el primer estado, conocido como alto espín (HS por sus siglas en Inglés) el acomodamiento de los electrones se da en los cinco orbitales d (de diferentes niveles de energía), para el segundo estado, estado de bajo espín (LS por sus siglas en Inglés) el acomodamiento de electrones está confinado al conjunto de orbitales d de menor energía (Figura 1). En la teoría de campo cristalino (TCC), el rompimiento de la degeneración de los orbitales d del metal (de misma energía) para un complejo octaédrico, se describe como el desdoblamiento de estos en dos grupos, en el primero, dos orbitales aumentan en energía y en el segundo, la energía de los otros tres disminuye, esto es conocido como desdoblamiento del campo cristalino, que es la diferencia de energía entre los dos grupos de orbitales y que se ve influenciada por la

presencia de los diferentes ligantes enlazados al centro metálico, divididos en ligantes de campo fuerte y de campo débil³. Los ligantes de campo fuerte (como CO, CN⁻), promueven un mayor desdoblamiento de campo cristalino y un mayor apareamiento de electrones dando complejos de bajo espín, mientras que ligantes de campo débil (como F⁻, OH⁻), tienden a desdoblar menos el campo cristalino, favoreciendo un máximo número de electrones desapareados, dando complejos de alto espín. Los cambios en el estado de espín afectan el tamaño de ambos iones Fe(II) y Fe(III), siendo los de alto espín significativamente más grandes que los de bajo espín. Este hecho juega un papel importante en el enlace cooperativo del dióxígeno en la hemoglobina¹. Los complejos con alto espín son cinéticamente lábiles, mientras que los complejos de bajo espín resultan ser prácticamente inertes ante intercambios de ligantes. Para ambos estados de oxidación, los complejos tetraédricos presentan únicamente alto espín. La versatilidad única del hierro viene dada por la extrema variabilidad en el potencial redox del par Fe²⁺/Fe³⁺ que puede ser “sintonizado” por ligantes selectos, así, los sitios de hierro presentan el más amplio rango de potenciales biológicamente significativos, desde -0.5 V hasta +0.6 V¹.

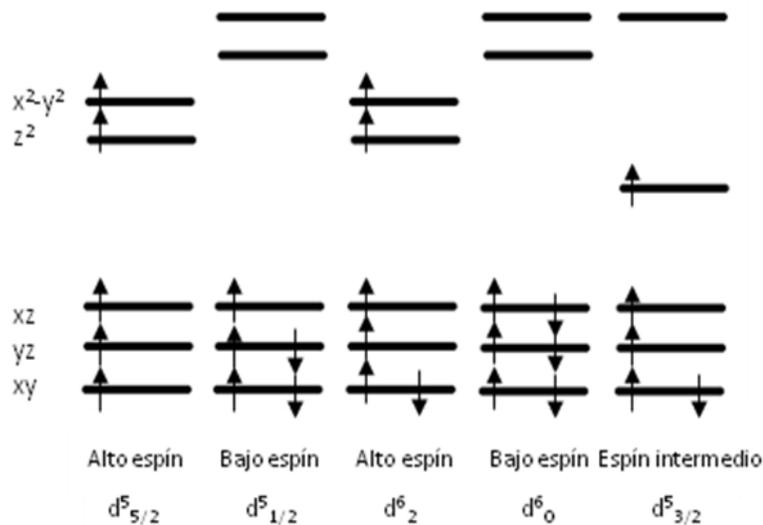


Figura 1. Representación de los posibles estados de alto y bajo espín del hemo para d^5 y d^6 . (tomado de Peisach, et al. 1968)⁴.

Técnicas espectroscópicas en metaloproteínas

Las metaloproteínas son proteínas que requieren de un ion metálico o un cofactor que contenga un metal por razones funcionales o estructurales⁵, en las que el grupo prostético o cofactor consiste en uno o más iones inorgánico o metal tales como Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} o Zn^{2+} ,⁶ que pueden estar coordinados por ligantes endógenos con nitrógeno, oxígeno y azufre provistos por las cadenas laterales de la proteína y que definen la primera esfera de coordinación del metal, o por ligantes exógenos no derivados de la proteína, tales como agua, óxidos, hidróxidos y sulfuros, incluso residuos de buffers como acetatos o fosfatos. Otra clase de ligantes exógenos de gran importancia, son las moléculas sustrato en reacciones de catálisis, reacciones que se realizan por metaloproteínas con actividad catalítica y especificidad biológica (metaloenzimas)^{6,7}.

Las metaloproteínas presentes en los organismos pueden ser clasificadas de acuerdo a varios criterios, por ejemplo, el papel funcional del ion metálico, definido como: (i) estructural, (ii) transporte y almacenamiento del ion metálico, (iii) transporte de electrones, (iv) aceptor de dioxígeno y (v) catalítico, siendo el último el papel más amplio y diverso¹.

Respecto a las técnicas espectroscópicas que pueden ser utilizadas para el estudio de metaloproteínas, las propiedades electrónicas y las altas densidades electrónicas de los iones metálicos (incluido el hierro) las hacen particularmente adecuadas para su análisis por métodos físicos como EXAFS (absorción de rayos X extendida de estructura fina, por sus siglas en inglés), Mössbauer, Raman, RMN (resonancia magnética nuclear) y EPR (espectroscopía paramagnética electrónica).

La desventaja de utilizar espectroscopía Mössbauer de ^{57}Fe es la baja abundancia natural de este isótopo (2.2%), por lo que sería necesario un enriquecimiento del mismo en la proteína, ya sea por reconstitución de la apoproteína o alternativamente, su aislamiento desde un medio de crecimiento que contenga sales de hierro enriquecidas con ^{57}Fe lo cual puede ser complicado y costoso, razones por las que desafortunadamente existe muy poca aplicación de este poderoso método a las metaloproteínas. De la difracción de rayos X de estructuras cristalinas se puede obtener información acerca de las distancias y geometrías metal-ligante; sin embargo, esto depende de la resolución del análisis. Información acerca de la geometría puede obtenerse por EXAFS que puede dar una resolución de hasta 0.001 nm, así que cuando se conoce la distribución del sitio de hierro, EXAFS resulta ser una

técnica complementaria que ayuda a resolver las distancias de los radios y geometrías de dicho sitio⁸. La cantidad de proteína y su concentración requerida para diferentes técnicas varía ampliamente, por ejemplo, en EPR se puede detectar iones de hierro de alto espín a bajas concentraciones, mientras que para estudios de RMN se requieren concentraciones mayores en el orden de μM^9 y mM^{10} respectivamente.

La técnica de EPR ha llegado a ser un método espectroscópico poderoso en el estudio de compuestos que contienen especies paramagnéticas. Ha sido altamente aplicada en el estudio de complejos de metales de transición, radicales orgánicos e inorgánicos, y metaloproteínas paramagnéticas. En los sistemas biológicos que contienen uno o más electrones desapareados, la espectroscopia EPR puede proporcionar información única de la estructura electrónica y geométrica, desde datos magnéticos como los valores de g , acoplamiento hiperfino y parámetros de núcleos cuadrupolares. Los valores de g o “tensor- g ” representa el acoplamiento entre el momento orbital y el momento angular de espín de los electrones (interacción espín-orbita), y es “equivalente” en utilidad al desplazamiento químico en RMN; estos valores proporcionan una medida cuantitativa del momento magnético de las moléculas, información única del tipo de especie paramagnética en el sistema. La forma de la señal del espectro depende de la simetría, obteniéndose espectro isotrópicos (Figura 2a) cuando todos los valores de g son iguales ($g_x=g_y=g_z$) observándose una sola señal, estos espectros corresponden, por ejemplo, a geometrías octaédricas y tetraédricas; se obtiene un espectro axial (Figura 2b) cuando uno de los valores de g es distinto a los otros ($g_x=g_y \neq g_z$) observándose dos señales, estos espectros corresponden, por ejemplo, a geometrías bipirámide trigonal, pirámide de base cuadrada, cuadrada plana y octaédricas elongadas y se obtienen espectros rómbicos u ortorrómbicos (Figura 2c) cuando los tres valores de g son distintos ($g_x \neq g_y \neq g_z$) observándose tres señales, que corresponden a geometrías angulares o lineales. El acoplamiento hiperfino caracteriza la distribución de espines en detalle y puede dar información de las distancias entre los núcleos y el electrón desapareado, este acoplamiento es debido a la interacción entre un electrón desapareado y un núcleo magnético (momento magnético nuclear). Las interacciones de los núcleos cuadrupolares proporcionan información del enlace del núcleo y puede también ser utilizado para determinar ángulos de enlace. Por estas razones, EPR es una técnica adecuada para el estudio de sistemas que no son accesibles para otras técnicas⁹.

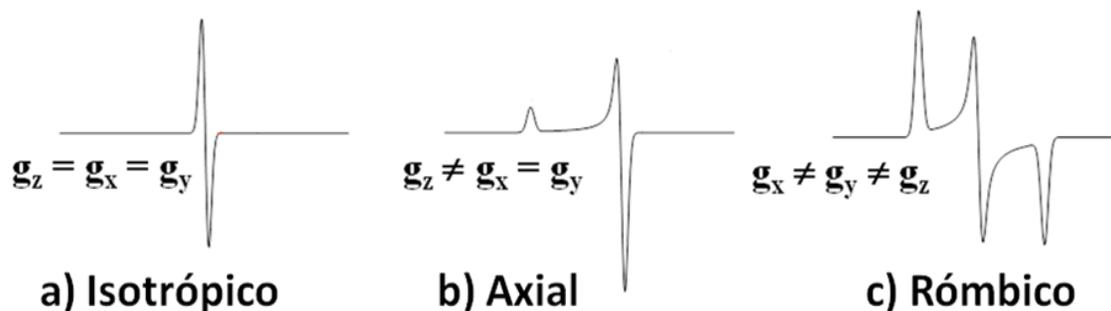


Figura 2. Forma de las señales de los espectros en EPR según la geometría.

En la forma férrica de las hemoproteínas son encontrados estados de bajo espín ($S=1/2$) y estados de alto espín ($S=3/2$ o $5/2$). La diferencia de estos estados de espín, como se mencionó previamente, sigue la teoría del campo cristalino, es influenciada por la presencia de los diferentes ligantes alrededor del ion metálico y la fuerza de enlace de los ligantes axiales.

Los valores de g para las hemoproteínas en estado férrico de bajo espín se han encontrado basados principalmente en el tipo y la orientación de los ligantes coordinados axialmente. F. A. Walker, identificó tres tipos de centros hémicos en estado férrico de bajo espín, el tipo I presenta ligantes axiales alineados en planos casi perpendiculares. El espectro de EPR de este tipo de hemo férrico de bajo espín presenta una sola señal y es observada sólo a baja temperatura (4-20 K), con una señal principal llamada “ g_{\max} ” con un valor normalmente mayor a 3.3; algunos ejemplos de estos centros de tipo I son, mioglobina coordinada por cianuro y el citocromo mitocondrial férrico b_{562} . Los centros hemo férricos de tipo II, presentan ligantes coordinados en planos alineados casi paralelos, su espectro puede ser observado a 70 K y muestran señales con valores de g aproximados de 1.2, 2.2 y 3; algunos ejemplos de este tipo son el citocromo férrico b_5 y el citocromo férrico c_2 . El tipo III presenta ligantes axiales en cualquier dirección, con señales en el espectro de EPR con valores de g aproximados de -2 y 2⁹.

Respecto a los espectros de EPR de hemoproteínas en estado férrico de alto espín, con sistemas $S=5/2$, presentan señales con valores de $g=6$ y 2; aunque, en algunos casos, también se han identificado estados de espín mezclados (QM, $S=3/2$ y $5/2$) para centros férricos de alto espín⁹.

La aplicación de la resonancia magnética nuclear (RMN) en metaloproteínas, es aplicable en el estudio de la interacción de las proteínas con otras moléculas, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos e incluso moléculas pequeñas, y está basada principalmente en la sensibilidad del desplazamiento químico hacia los cambios en el entorno químico. La aplicación de esta técnica a estudios estructurales está limitada a proteínas pequeñas (30-35 kDa) y tanto para proteínas como para metaloproteínas, las concentraciones requeridas son, de al menos, 1 mM y éstas deben ser solubles y estables. Además de su aplicación en estudios estructurales, es posible monitorear los movimientos internos de biomoléculas que van desde sub-nanosegundos hasta segundos¹⁰.

La espectroscopía Raman permite identificar la presencia o ausencia de unidades de estructuras particulares y los modos de enlace de los aminoácidos, lo cual la ha hecho una poderosa técnica en el estudio de la estructura y función de proteínas. Es una técnica altamente selectiva debido a que sólo aquellos modos de vibración que están relacionados con la parte cromofórica de la molécula pueden ser mejoradas, y estos modos mejorados son los únicos observables. Debido a lo anterior, estas vibraciones de los grupos cromóforos son las que pueden ser monitoreadas en las biomoléculas. Y si el cromóforo forma parte del sitio bioquímicamente activo, como comúnmente sucede, la técnica puede proporcionar información estructural acerca de las partes químicamente significativas, facilitando así, monitorear los cambios estructurales asociados con la reactividad. Esta técnica, requiere pequeñas cantidades de muestra y es independiente del estado físico de la muestra, haciéndolo el método ideal para el estudio de proteínas¹¹.

Hemoproteínas

Existen muchas proteínas y enzimas en la naturaleza que contienen como grupo prostético un grupo hemo que consiste en un ligante porfirina compuesto por un macrociclo tetrapirrólico que coordina hierro (ferriprotoporfirina IX) y que se encuentra en una cavidad hidrofóbica dentro de las proteínas. Los ligantes porfirina, por sí solos, tienen la capacidad de coordinar casi cualquier metal transicional así como también algunos no metales¹². Sin embargo, de todos los metales de la serie Irving-Williams, pocos son incorporados *in vivo*, como Fe²⁺ y Mg²⁺, aunque todos los demás han sido incorporados en el anillo por síntesis química¹³.

En los compuestos naturales derivados de porfirinas, los ocho átomos de carbono de los pirroles en las porfirinas están completamente sustituidos por cadenas laterales¹⁴. De acuerdo a la naturaleza y posición de los sustituyentes, se pueden encontrar ocho clases de hemo: hemo a-d, hemo d1, hemo o, hemo P460 y siro hemo, mismos que son característica de las diferentes hemoproteínas² (Figura 3). La naturaleza de estas cadenas es importante para proveer estabilidad adicional a la interacción entre el grupo hemo y la proteína, en algunos casos, los sustituyentes de la porfirina están también enlazados a la estructura proteica. Un gran número de hemoproteínas cercanamente relacionadas muestran una ligera diferencia en sus propiedades redox, se propone que la presencia de diferentes sustituyentes en el anillo de la porfirina podrían contribuir a estas ligeras diferencias, aunque cuando se requieren de mayores cambios en sus propiedades, otros factores como la naturaleza del quinto y sexto ligante o la función del grupo distal en la proteína son importantes¹⁴.

Aunque la mayoría de las metaloporfirinas involucran iones metálicos tetracoordinados, otras presentan iones metálicos pentacoordinados con estructura de pirámide de base cuadrada o geometría octaédrica distorsionada para los iones metálicos hexacoordinados, formados por la coordinación de uno o dos ligantes al ion metálico en las posiciones axiales¹⁴. El tipo de ligante en la posición axial del grupo hemo puede variar, modificando las propiedades o función de la hemoproteína, incluso su estado electrónico, por ejemplo, un enlace largo Fe-ligante resulta en un estado de alto espín o espín intermedio del hierro en el hemo¹², ya que tanto el hierro de alto espín de Fe(II) o Fe(III), el de bajo espín y el espín intermedio se encuentran bastante cercanos en energía, en un equilibrio de estados de espín¹³.

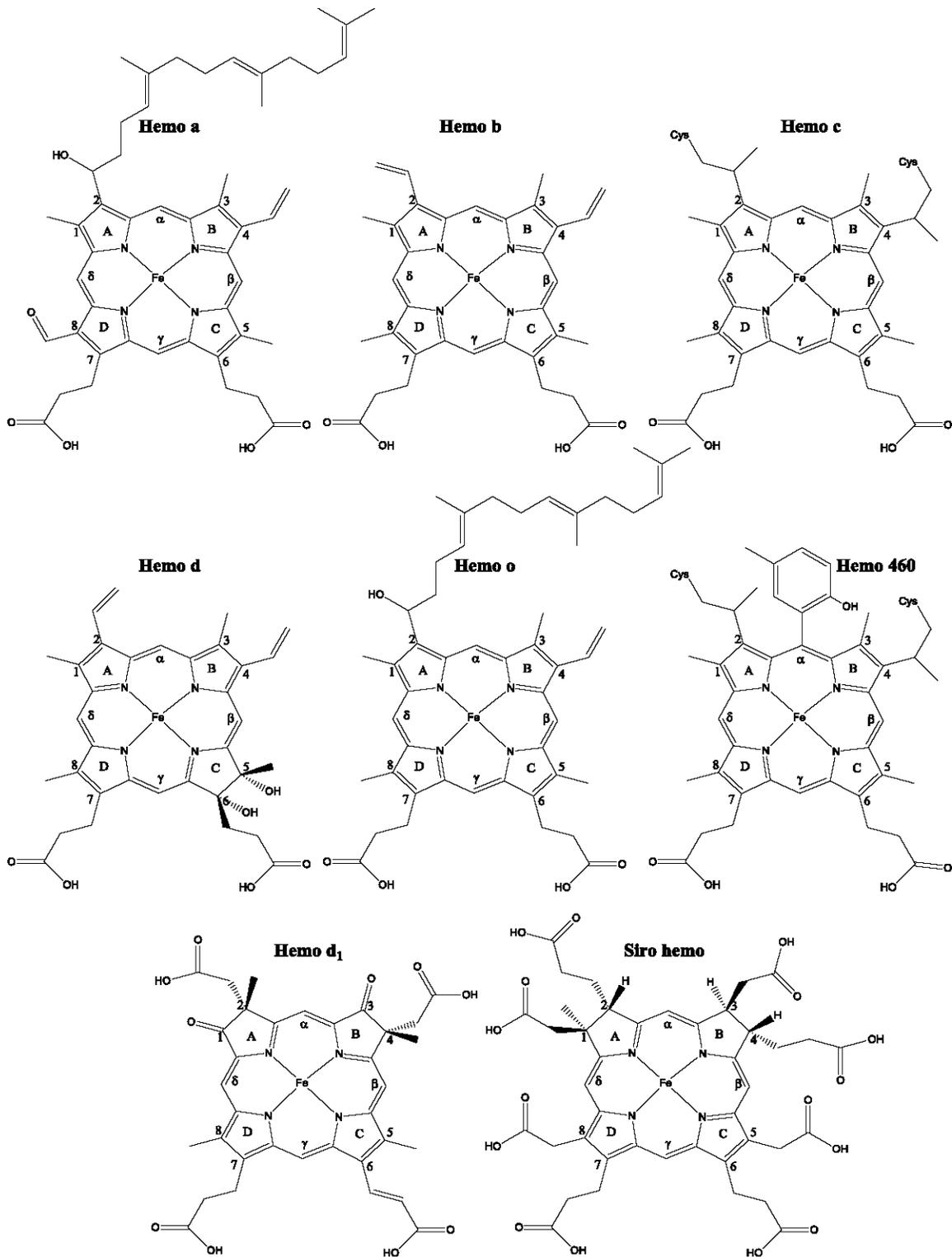


Figura 3. Esquema de los diferentes grupos hemo (modificado de Heme Peroxidases. Dunford, 1999)².

El ligante porfirina es un buen donador σ , por las cargas negativas de los nitrógenos en su forma desprotonada (N^-), además es también un aceptor π muy efectivo. El diagrama de nivel de energía de la unidad Fe-porfirina muestra la cooperatividad del metal y el ligante (Figura 4). El hierro de bajo espín tiene propiedades químicas especiales ya que es un buen donador π que puede, por ejemplo, asistir el enlace de O_2 , CO y NO ¹³.

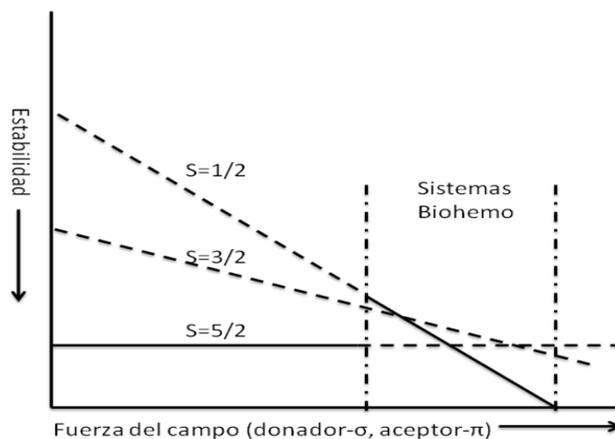


Figura 4. Diagrama de la variación de estabilidad de los estados de espín (S) del Fe(III) hémico respecto a fuerza del campo que ejerce el quinto y sexto ligante. En la región de los sistemas biohemo, los tres niveles de energía para los diferentes estados de espín se encuentran cercanos entre sí (Tomado de The Biological Chemistry of the Elements. The Inorganic Chemistry of Life)¹³.

Los complejos Fe-porfirina, además de estar involucrados en el transporte de oxígeno, también participan en una gran variedad de procesos catalíticos bioquímicos¹⁵. Las principales funciones de las proteínas y enzimas que contienen hierro son: transferencia de electrones (enzimas y proteínas redox, citocromos); acarrear y enlazar oxígeno (hemoglobina y mioglobina); catálisis de oxidaciones por dioxígeno y peróxido de hidrógeno (oxidasas y peroxidasas); catálisis de la descomposición de peróxido de hidrógeno (catalasas) e insertar átomos de oxígeno o dioxígeno dentro de moléculas orgánicas¹⁴. En la Figura 5, se enlista la clasificación de las hemoproteínas conocidas por su función bioquímica y la reacción que llevan a cabo¹².

A excepción de las proteínas transportadoras de electrones, las hemoproteínas presentan un hierro pentacoordinado, dejando la sexta posición abierta para enlazar otro ligante o para la actividad catalítica¹⁶. Esta condición puede revertirse a pHs básicos donde un aminoácido se asocia al Fe en la sexta coordinación, a veces de manera irreversible y se conoce como transición alcalina¹⁷.

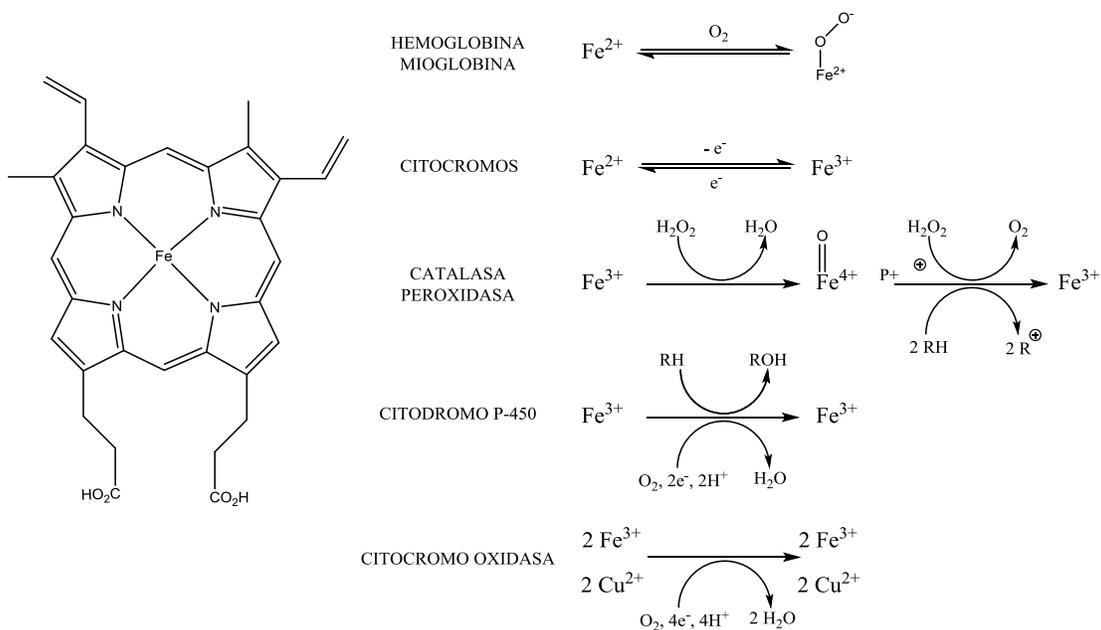
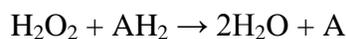


Figura 5. Hemoproteínas y sus funciones bioquímicas. (tomado de Metals in Biological Systems)¹².

Hemoperoxidasas

Las peroxidasas son enzimas que catalizan la oxidación de un gran número de moléculas reductoras usando peróxido como aceptor de electrones.



Las peroxidasas se encuentran en animales, plantas y microorganismos, actualmente se dividen en dos superfamilias principales, la primera corresponde a las peroxidasas-ciclooxigenasas que consta de peroxidasas animales y la segunda familia corresponde a las peroxidasas de plantas o no-animales. Sin embargo, existen nuevos grupos de peroxidasas que no pueden incluirse en alguna de las dos superfamilias anteriores, uno de estos es comprendido por las hemotiolatoperoxidasas y las peroxigenasas aromáticas (APOs), en el siguiente grupo se encuentran las peroxidasas decolorantes, que provienen de hongos y eubacterias^{18,19}.

La superfamilia de peroxidasas de plantas o no animales, puede ser dividida en tres clases (I, II y III). La clase I incluye enzimas intracelulares en plantas, bacterias y levaduras, tales como citocromo *c* peroxidasa, peroxidasas bacterianas y ascorbato peroxidasa. La clase II incluye peroxidasas extracelulares de hongos, como lignino peroxidasa y manganeso peroxidasa. La clase III comprenden a las enzimas de plantas secretadas fuera de la célula o transportadas dentro de vacuolas, esta clase incluye a la peroxidasa de rábano²⁰.

Las peroxididas de plantas (o de clase III) constan de una sola cadena polipeptídica de aproximadamente 300 aminoácidos, una protoporfirina IX de Fe(III) (grupo hemo b) y factores considerados importantes para mantener la estabilidad y actividad de la proteína, como son las glicosilaciones, dos átomos de calcio y cuatro puentes disulfuro^{21,22}. Sus potenciales de reducción, que se encuentran en el rango de 278 mV²³ a 90 mV²⁴, son modulados entre otros factores, por el ligante axial al hemo y, consecuentemente, por la fuerza del enlace Fe-Nε2 determinada por la relativa posición y distancia de la histidina proximal con respecto al hierro²⁵. A pesar de su baja conservación a nivel de secuencia de aminoácidos, las hemoperoxidasas de clase III de plantas presentan tres dominios altamente conservados que son: la región distal (en la figura 6, sitio en donde se localizan la His52 y Arg48) región fundamental para la catálisis, la región proximal (en la figura 6, sitio en donde se localiza la His175) que es el sitio de coordinación del quinto ligante y un dominio central del que se desconoce su función (Figura 6 y 7)^{20,25}.

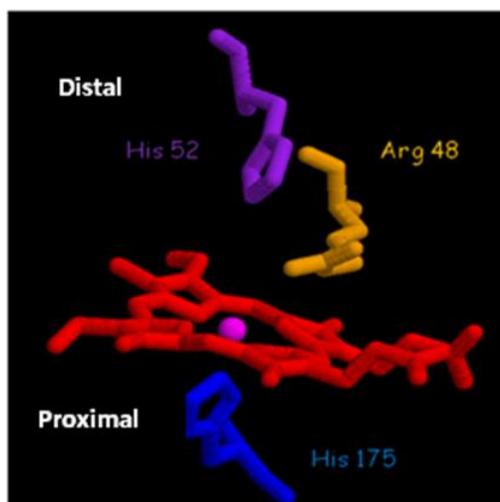


Figura 6. Representación tridimensional de los sitios distal y proximal conservados en las hemoperoxidasas.

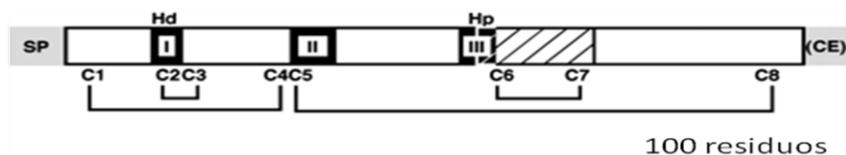


Figura 7. Esquema de las estructuras de las hemoperoxidasas. Péptido señal (SP), C-terminal (CE), las regiones conservadas se representan en la zona negra, el dominio catalítico del lado distal al hemo (I), el enlace proximal al hemo (II), una región variable en la zona rayada, se señalan dos histidinas invariables de las regiones distal (Hd) y proximal (Hp), además las 8 cisteínas (C1 a C8) indicando los puentes disulfuro. (tomada de Hiraga, et al. 2001)²⁰.

El grupo hemo de las hemoperoxidasas se encuentra situado entre el dominio distal y el dominio proximal, la estructura está constituida principalmente por α -hélices como se muestra en la figura 8 y presentan un grupo prostético hemo b, el cual tiene cuatro grupos metilo en las posiciones 1, 3, 5 y 8, dos grupos vinilo en las posiciones 2 y 4 y dos propionatos en las posiciones 6 y 7. La nomenclatura IUPAC de esta porfirina es 1,2,5,8-tetrametil-2,4-divinilporfirina-6,7 ácido dipropiónico, (Figura 3, hemo b). Además, presentan un alto número de glicosilaciones en la superficie²⁵.

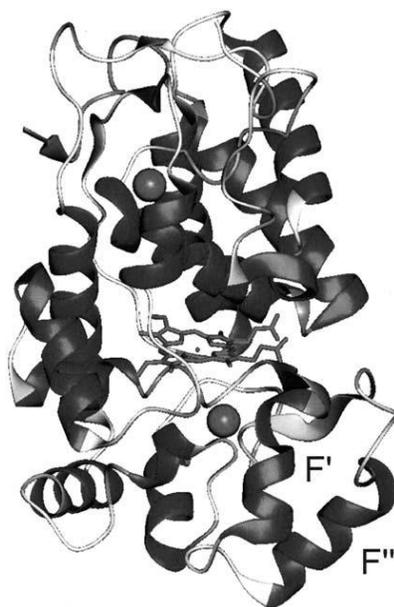


Figura 8. Estructura tridimensional de HRPc, constituida principalmente por α -hélices.
(tomado de Veitch, 2004)²⁶.

Los compuestos inorgánicos de hierro están comúnmente hexacoordinados, aunque en las enzimas de Fe(III) es común encontrarlos pentacoordinados. En el caso específico de las peroxidases, las posiciones 1-4 están ocupadas por los cuatro átomos de nitrógeno de los pirroles en la porfirina, la quinta posición, localizada en el lado proximal del hemo, está comúnmente ocupada por un grupo imidazol proveniente de una histidina en la cadena lateral, que se caracteriza por su carácter aniónico debido a la presencia de un puente de hidrógeno fuerte entre la histidina y un residuo de ácido aspártico, el cual es altamente conservado²⁷ (Figura 9); esta propiedad del quinto ligante, modula la reactividad de la peroxidasa y contribuye al valor bajo y negativo del potencial de reducción del hierro, el cual estabiliza altos estados de oxidación del metal²⁵.

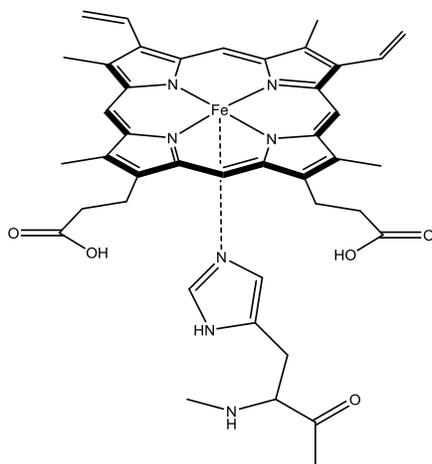


Figura 9. Coordinación de hierro hémico de peroxidasas. Formación de un puente de hidrógeno entre la histidina y el hierro en la región proximal.

La sexta posición está vacante, por lo que presenta un estado de alto espín para el hierro ($S=5/2$)²⁵, se encuentra localizada en la región distal del hemo y justo ahí es el sitio de interacción con el peróxido de hidrógeno donde ocurren muchas de las reacciones de peroxidasas². Esta región se caracteriza por tener dos aminoácidos invariantes, conocidos como histidina distal y arginina distal que producen una cavidad hidrofílica, estos residuos hidrofílicos estabilizan un extenso cúmulo de moléculas de agua a través de puentes de hidrógeno, que junto con el fuerte enlace Fe-N (histidina proximal) previenen la coordinación de moléculas de agua al hierro²⁵.

Una característica importante que no es inmediatamente obvia, es la existencia de una red de interacciones por puente de hidrógeno que une los residuos distales y proximales de la cavidad del hemo, la cual se extiende incluyendo los dos sitios de enlace de los átomos de calcio. La existencia de esta red ha sido evidenciada por los datos cristalográficos y por estudios espectroscópicos de la mutación de la peroxidasa de rábano blanco (Figura 10). La operación de esta red ha sido sugerida por Dunford como un conductor del flujo de electrones entre las regiones distal y proximal de grupo hemo²⁸.

Todas las estructuras de rayos X de peroxidasas muestran en el sitio activo hemo al menos cuatro moléculas de agua bien ordenadas, las cuales son invariantes en estas estructuras²⁵. Estas moléculas de agua se encuentran presentes en la cavidad distal, a través de los puentes de hidrógeno que conectan los residuos hidrofílicos presentes, forman una extensa red que une la His distal y a la Arg a un propionato, un residuo hidrofílico siempre presente

cercano al disolvente en el lado expuesto del grupo hemo. La otra molécula de agua conservada está presente en el lado proximal, donde se encuentra invariabilmente enlazada por puentes de hidrógeno a la Asp proximal (Figura 10)^{25,29}.

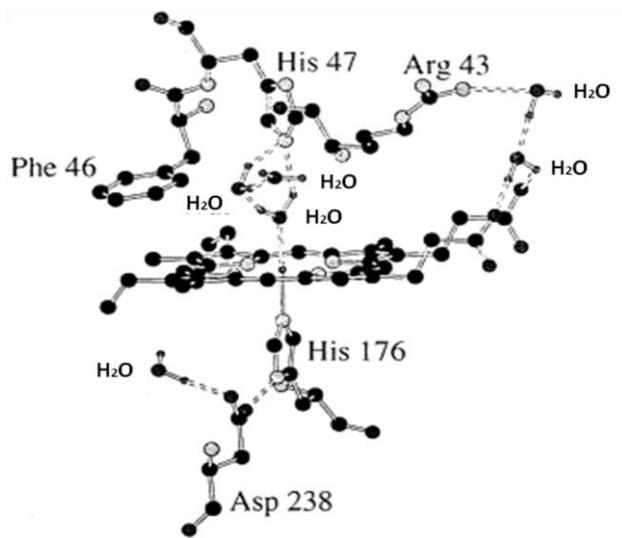


Figura 10. Red de puentes de hidrógeno alrededor del hemo en LiP (Poulos et al., 1993), y moléculas de agua que interactúan en la formación de los puentes. (tomado de Banci et al. 1997)²⁵.

Los dos iones de calcio presentes tienen un papel esencialmente estructural, los sitios de unión de estos han sido identificados como altamente conservados en peroxidasas de plantas localizado uno en el lado del dominio proximal y el segundo en el del dominio distal. El primero, está formado por ocho átomos de oxígeno del esqueleto de la proteína y las cadenas laterales de los grupos residuales; este ion de calcio está fuertemente enlazado debido a que su sitio de unión se encuentra alejado de la superficie y por lo tanto es menos accesible al disolvente. El sitio de enlace del segundo ion de calcio está formado por siete átomos de oxígeno que pertenecen también al esqueleto de la proteína y a las cadenas de los residuos distales en ella (Figura 11); este calcio se encuentra menos fuertemente unido, probablemente debido a que se encuentra más cercano de la superficie y por lo tanto más expuesto al disolvente. Además, un ligante de cada ion de calcio, corresponde al que sigue inmediatamente después de las histidinas distal y proximal respectivamente. Se ha demostrado que remover cualquiera de los dos iones de calcio se traduce en la reducción de la actividad de la enzima, y más aun, cuando ambos iones son removidos, la actividad se pierde por completo, posiblemente por inestabilidad en el plegamiento; la figura 12 muestra

el efecto de la remoción de los iones de calcio en el espectro de absorción en la región de la banda soret.^{25,30}.

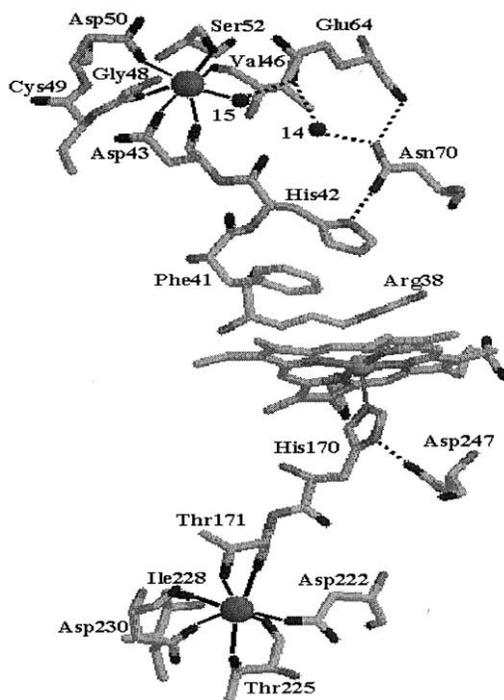


Figura 11. Sitios de unión del calcio distal y proximal de HRPC. (tomado de Howes et al. 2001)²¹.

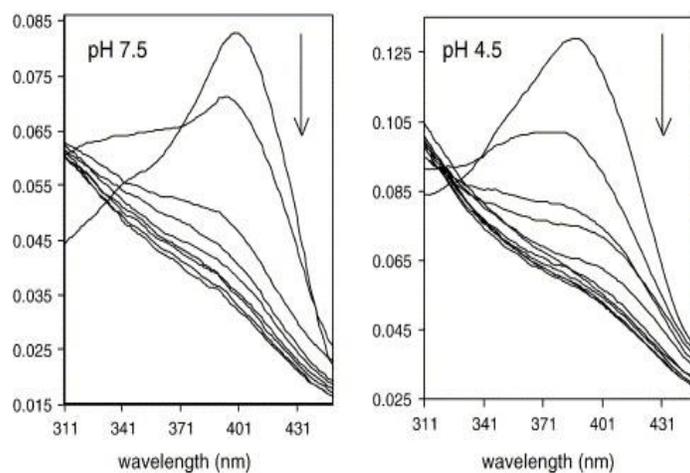


Figura 12. Disminución de la banda Soret de una peroxidasa variante de *Bjerkandera adusta* carente de Ca^{2+} , incubada en presencia de 1 mM de H_2O_2 . El espectro fue obtenido cada 3 minutos a 25 °C. La flecha indica la dirección del cambio en la absorbancia. (tomado de Verdín, et al. 2006)³⁰.

La importancia de las glicosilaciones en proteínas es debida a que repercuten tanto en sus propiedades fisicoquímicas como en sus funciones biológicas, haciéndolas más solubles y reduciendo la flexibilidad de la cadena principal, aumentando así la estabilidad de la estructura, protegiéndola de la proteólisis³¹. Las hemoperoxidasas de plantas están altamente glicosiladas, llegando a representar hasta el 30 % de su masa³². En el caso de HRP2 presenta 7 glicosilaciones, HRPC ocho³³ y ZoPrx presenta al menos 7 glicosilaciones localizadas en las asparaginas 5, 15, 137, 149, 187, 199 y 269³⁴ (Figura 13).

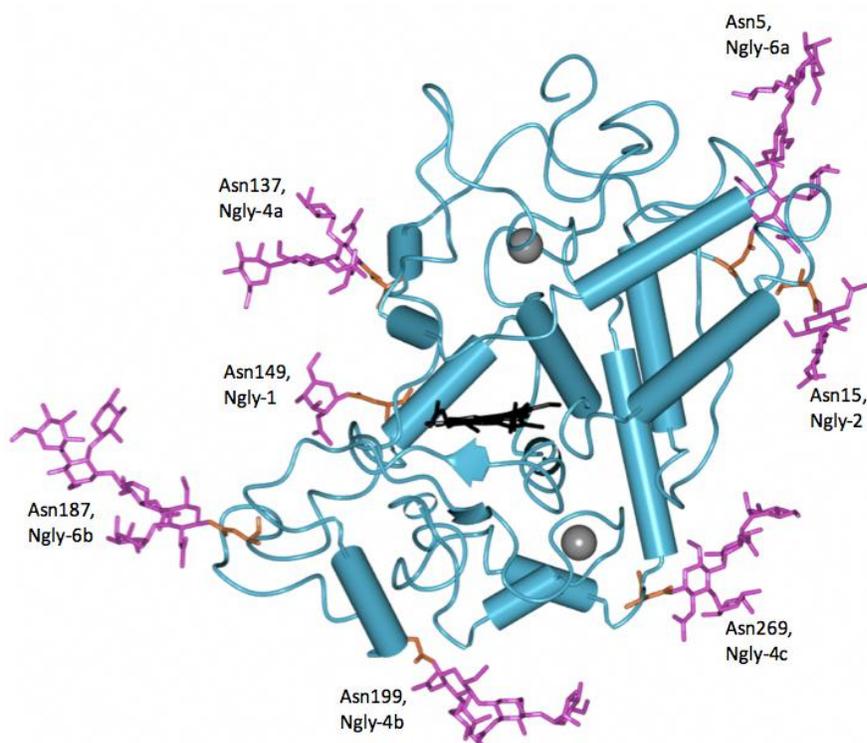


Figura 13. N-glicosilaciones presentes en la ZoPrx. Representación estructural de Richardson de las 7 glicosilaciones de la enzima, se muestra además los sitios de unión de los iones calcio (proximal y distal)³⁴.

Los cuatro puentes disulfuro en HRP2 por ejemplo, están formados por ocho residuos de cisteína en las posiciones 11-91, 44-49, 176-208 y 97-299, los cuales son también residuos conservados en la superfamilia de las peroxidasas de plantas^{19,33}.

Las hemoperoxidasas han sido estudiadas por su gran versatilidad de funciones fisiológicas tales como la lignificación, la formación de la pared celular, la defensa contra agentes patógenos, como parte de procesos catabólicos, etcetera³². Además, presentan un gran número de aplicaciones biotecnológicas: como bioanalíticos en *kits* de análisis enzimático o

como biosensores enzimáticos para análisis clínicos de metabolitos, por ejemplo, glucosa, colesterol, triglicéridos y ácido úrico; también para análisis y síntesis estereoespecífica de algunos fenoles y anilinas utilizados como fármacos y reactivos químicos; en la elaboración de productos de panadería, decoloración de textiles; en el proceso de blanqueado de papel, o en los detergentes domésticos, en la degradación de contaminantes; en bioreactores enzimáticos para la depuración de vertidos industriales contaminados con fenoles o anilinas, etcetera¹⁷.

A pesar de la gran versatilidad que tienen las hemoperoxidasas, sus aplicaciones en la industria se han visto limitadas por su comportamiento bajo las condiciones de uso y por los agentes desnaturalizantes que usualmente involucran los procesos industriales, como son: disolventes orgánicos, altas temperaturas, valores extremos de pH, detergentes, agentes oxidantes y metales. En particular, uno de los factores limitantes más importantes para la aplicación industrial de las hemoperoxidasas es la inactivación de éstas por el peróxido de hidrógeno³⁵.

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

Mecanismo de las hemoperoxidasas

La relación entre los diferentes componentes de la estructura de las peroxidases y la función de este grupo de enzimas puede ser estudiado en dos pasos: la reacción con peróxido de hidrógeno y la interacción con el sustrato reductor, mismos que son comprendidos por el mecanismo catalítico de la enzima como se muestra en la figura 14²⁶.

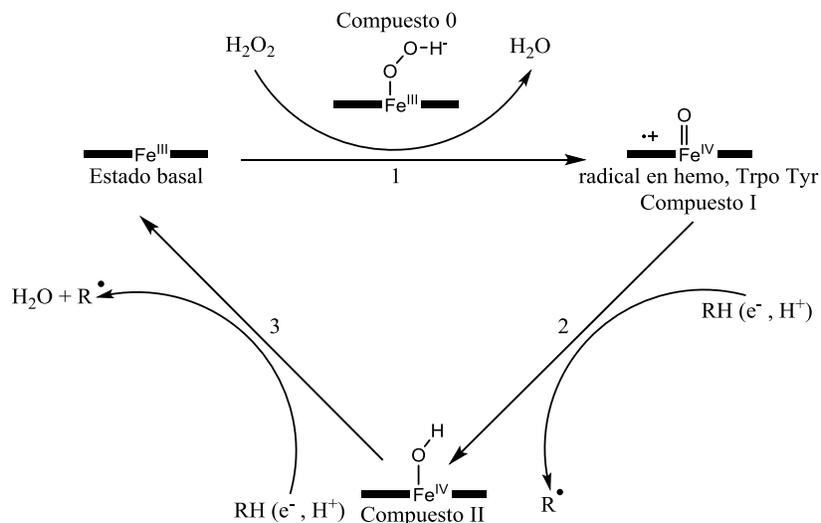


Figura 14. Mecanismo de ciclo catalítico de las hemoperoxidasas. (Adaptado de Veitch et al. 2004 y Hersleth et al., 2006)^{26,36}.

Compuestos I y II

En el primer paso del ciclo, la reacción entre estado basal de la enzima y el peróxido de hidrógeno genera un intermediario de alto estado de oxidación conocido como “compuesto I”, este intermediario es un centro oxoferrilporfirina (Fe^{IV}) con un radical catión y es además, una especie paramagnética activa en EPR; en el primero de dos pasos subsiguientes, se lleva a cabo la reducción en un electrón donde el compuesto I es reducido al “compuesto II” y el sustrato reductor RH es oxidado a un producto radicalario R·. El compuesto II es también una especie oxoferril (Fe^{IV}), una especie diamagnética silenciosa en EPR. El ciclo es completado por un segundo paso de reducción en un electrón, en el cual otra molécula de sustrato reductor es oxidada al correspondiente producto radicalario y se restablece el estado basal de la proteína^{22,26}.

La relación estructural entre los aminoácidos en la cavidad del grupo hemo involucrados en la catálisis es invariante o altamente conservada en todas las peroxidasa de plantas de clase III. Usando como ejemplo la peroxidasa de cacahuete, se puede observar que en el lado proximal del plano del grupo hemo, la His169 (histidina proximal) está directamente coordinada al átomo de hierro, a través del átomo de nitrógeno de la cadena lateral Nε2 (Figura 15)²².

En el lado distal del plano del hemo los residuos de mayor importancia son Arg38, His42 y Asn70; la His42 se encuentra más alejado del átomo de hierro que la His169, por lo que el

sexto sitio de coordinación está vacante y disponible para enlazar un ligante (Figura 15), por ejemplo cianuro, azida, fluoruro, CO y NO. La arquitectura del hemo con un hierro férrico de alto espín coordinado a la histidina proximal, la histidina distal y al residuo de arginina conservados juega importantes papeles en la formación del compuesto I²².

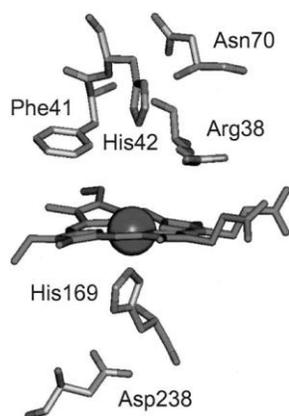


Figura 15. Residuos de aminoácidos en la cavidad hemo de una peroxidasa típica de plantas (peroxidasa de cacahuete). El hierro en el hemo (Fe^{III} en el estado basal de la enzima) se muestra como una esfera y coordinado por la histidina proximal (His 170 en HRPC). El sexto sitio de coordinación en el plano distal del hemo está vacante. (tomado de Veitch et al. 2004)²⁶.

La estructura cristalográfica ha revelado que el lado distal del hemo es similar para las peroxidases de plantas que se muestran en la tabla 1:

Tabla 1. Datos de las estructuras tridimensionales de peroxidases de plantas determinadas por cristalografía de rayos X (Modificado de Veitch et al. 2004)²⁶.

Especie; Nombre común (Inglés)	Isoenzima Peroxidasa / PDB	Fuente	Condición	Resolución (Å)
<i>Arabidopsis thaliana</i> ; Berro (Thale cress)	AtPA2/1PA2	Recombinante	Edo. Basal	1.45
	AtPN/1QGJ	Recombinante	Edo. Basal	1.90
<i>Arachis hypogea</i> ; Cacahuete (Peanut)	PNP/1V2H	Cultivo celular	Edo. Basal	2.70
<i>Armoracia rusticana</i> ; Rábano picante (Horseradish)	HRPC/1GW2	Recombinante	Edo. Basal	2.15
	HRPE5/3OVQ	Raíz	Edo. Basal	2
<i>Glycine max</i> ; Soya (Soybean)	SBP/4MLC	Recombinante	Edo. Basal	2.70
<i>Hordeum vulgare</i> ; Cebada (Barley)	BP1/3NNA	Semilla	Edo. Basal	1.90

La peroxidasa de cebada es una excepción, ya que la orientación de la His distal se encuentra localizada demasiado lejos del átomo hierro del grupo hemo para catalizar la formación del compuesto I²⁶.

La formación del compuesto I por la reacción de la proteína en estado férrico con peróxido de hidrógeno consiste en la transferencia de un átomo de oxígeno del peróxido al hierro del hemo; este compuesto I está oxidado en dos electrones respecto a la especie nativa. Un electrón es tomado del átomo de hierro, llevando el estado de oxidación de férrico a ferril, y un segundo electrón es tomado de un aminoácido cercano al grupo hemo o del anillo de porfirina, resultando en la oxidación de un residuo de aminoácido a un catión radical o la generación de un radical porfirina. Algunos experimentos de medición de susceptibilidad magnética hechos con el compuesto I de HRP indican que éste contiene tres electrones desapareados ($S=3/2$)⁴. Esto ha sido interpretado como indicación de que el compuesto I de HRP contiene un hemo ferril (Fe^{IV}) y un radical π catión de porfirina. En otras hemoenzimas, el radical ha sido identificado sobre un residuo de aminoácido aromático^{22,37} normalmente triptófano^{38,39}.

Un mecanismo para la catálisis de hemoperoxidasas en el cual los papeles específicos son asignados a la His y la Arg distal de la peroxidasa, fue propuesto por Poulos y Kraut, basado en la estructura cristalográfica de la citocromo *c* peroxidasa⁴⁰. Se establecieron dos importantes principios en el mecanismo, el primero, que el átomo de nitrógeno Nε2 de la histidina distal de la cadena lateral actúa como un aceptor de un protón del peróxido de hidrógeno enlazado en el sexto sitio de coordinación vacante del átomo de hierro del hemo y el segundo, que la Arg asista en la estabilización de la carga durante la formación del compuesto I. El hecho de que la Arg y la His distal son esencialmente invariantes en todos los miembros de la superfamilia de las peroxidasas de plantas sugiere que este mecanismo podría ser aplicado a las peroxidasas de plantas de clase III.

Una representación del papel de los residuos de la cavidad en el sitio distal del hemo en la formación del compuesto I es dado por la figura 16 que muestra el compuesto I de HRP, en el que el átomo de oxígeno en el ferril está enlazado por puentes de hidrógeno a la Arg38 NεH y a una molécula de agua que a su vez está enlazada a Arg38 y la His42, molécula de agua que se forma de la ruptura heterolítica de la unión del peróxido²⁶.

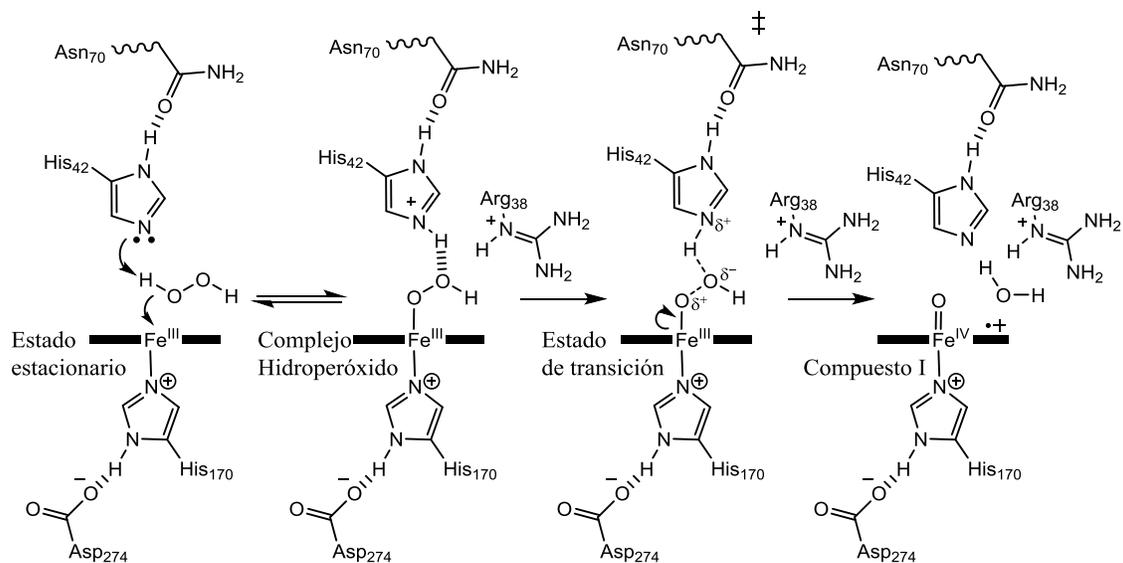


Figura 16. Formación del compuesto I de HRP C (Tomado de Veitch et al., 2004)²⁶.

La reducción en un electrón del compuesto I, genera un segundo intermediario, conocido como compuesto II, oxidado en un electrón respecto a la hemoperoxidasa en estado férrico. Por lo que se sabe, la reducción del compuesto I a compuesto II y la reducción del compuesto II resulta en el regreso de la proteína o del radical de porfirina a su estado nativo. La reducción en un electrón del compuesto II a la forma nativa de la proteína involucra la reducción del hierro oxoférrico a estado férrico así como también la reducción de un átomo de oxígeno a agua (Figura 17)³⁷.

Las especies radicalarias que son generadas, reaccionan para dar aductos del grupo hemo, los cuales reflejan el ambiente local de sitio de interacción del sustrato^{28,41}. Las peroxidasa de plantas son consideradas ejemplos de hemoenzimas con una arquitectura del grupo hemo cerrada, en la cual, se previene el acceso al ferril oxígeno del compuesto I. La principal restricción estructural es la conservación de una voluminosa cadena lateral, con residuos como Phe41 en el caso de HRPC²⁶.

El poder oxidante de los intermediarios con altos estados de oxidación de las peroxidasa de plantas ha sido establecido por la medición de sus potenciales de redox. En el caso de la HRPC, el potencial redox de los compuestos I y II son cercanos a +1 V a pH neutro⁴². Esta demostración de que ambos potenciales redox fueron similares fue un importante resultado, ya que previamente se pensó que el compuesto I, por ser más reactivo era necesariamente un oxidante más fuerte que el compuesto II. La diferencia en reactividad

entre ambos compuestos puede ser interpretada en términos de la teoría de Marcus de transferencia de electrones, donde la relativa distancia con el sustrato reductor y el alto estado de oxidación de los intermediarios es un factor crítico (impedimento estérico). La distancia para la transferencia del electrón del sustrato reductor al radical porfirina π catión del compuesto I es menor que para el átomo de hierro del hemo oxoferril del compuesto II. Por ello, se deduce, que un sustrato voluminoso en el sitio de interacción sustrato-enzima disminuye la reactividad debido a que incrementa la distancia de la transferencia de electrones²⁶.

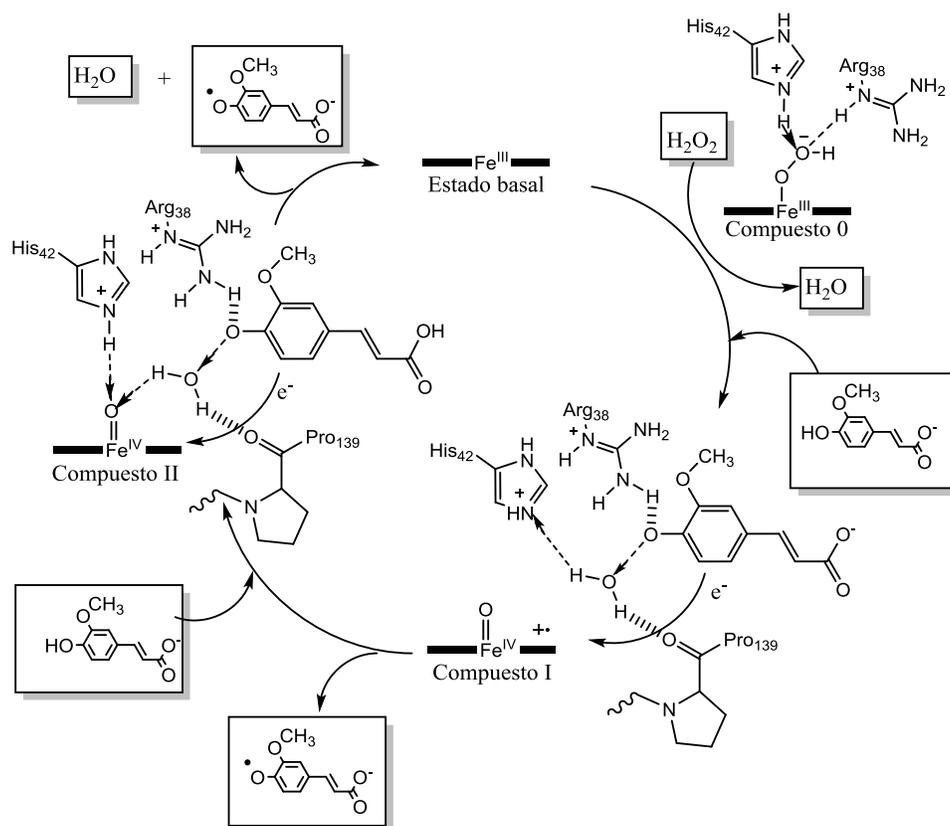


Figura 17. Mecanismo de reducción del compuesto I, compuesto II y oxidación del sustrato. (adaptado de Veitch et al., 2004 y Henriksen et al., 1999)^{26,29}.

Las peroxidasas de plantas a menudo se describen como enzimas con una amplia especificidad de sustratos por el relativamente pequeño número de restricciones para determinar su sustrato reductor (RH), principalmente por el poder oxidante de los compuestos I y II y la accesibilidad del sitio de interacción con el sustrato entre otros

factores. Sin embargo, se han demostrado algunas preferencias con respecto a la unión de sustratos^{25,26}.

Sustrato reductor

Los dos pasos de reducción, para convertir el compuesto I a compuesto II y el compuesto II al estado basal requieren la participación de sustratos reductores, los típicos ejemplos de éstos en el caso de peroxidasas de plantas son aminas aromáticas, indoles, ácidos fenólicos, fenoles y azo-colorantes (Figura 17). El perfil de los productos de la reacción catalizada por peroxidasas es complejo debido a la formación de dímeros y oligómeros más grandes que pueden actuar como sustratos de la peroxidasa²⁶.

La oxidación de moléculas sustrato por peroxidasas de plantas está acompañada de la transferencia de electrones (Figura 17). El puente de hidrógeno entre el N_{H2} de la Arg38 y el oxígeno fenólico asisten la transferencia de un protón del fenol a la histidina distal u oxígeno ferril. El destino final del protón es la histidina distal en el caso de la reducción del compuesto I. En el caso de la reducción del compuesto II, la arginina distal asiste la transferencia del protón con un puente de hidrógeno entre el oxígeno fenólico y una segunda molécula de sustrato. En este caso, el destino final del protón es el oxígeno del ferril, y un electrón es transferido al hemo. Ambos protones transferidos pueden involucrar una molécula de agua, la cual está posicionada de manera equidistante entre la histidina del sitio activo y la posición anticipada del oxígeno del ferril en el compuesto I y II²⁹.

Experimentos basados en el mecanismo de inactivación enzimática han sido usados como un método para determinar sitios potenciales para la oxidación del sustrato. Estos involucran la incubación de la peroxidasa con peróxido de hidrógeno y un agente reactivo (reductor) como fenilhidrazina o azida de sodio, los radicales libres que se generan reaccionan para formar aductos hémicos que reflejan el ambiente local del sitio de interacción del sustrato²⁶.

Compuesto III

En ausencia de sustrato reductor, o cuando se expone a una alta concentración de peróxido de hidrógeno, las hemoperoxidasas muestran una tendencia a la desactivación, en la cual, el peróxido convierte el compuesto II en un compuesto muy reactivo, llamado compuesto III,

que es el radical peroxi-ferril(III) porfirina y que puede seguir diferentes vías de oxidación^{43,44}.

El compuesto III de peroxidasas fue reportado por primera vez por Keilin y Mann en la reacción de HRP en presencia de exceso de H₂O₂⁴⁵. El compuesto III es una especie análoga a la oxihemoglobina y la oximioglobina, ya que todos contienen un hierro hemo de bajo espín, con una histidina y una molécula de dioxígeno en el quinto y la sexta posición de ligante respectivamente^{46,47}.

Como todos los intermediarios del ciclo catalítico de las peroxidasas, el compuesto III presenta propiedades espectroscópicas muy características. Por ejemplo, en el espectro óptico, en la región visible se refleja principalmente la estructura electrónica de la porfirina, en la que se observa una señal de la banda Soret con un máximo a 416 nm y dos más a 540 y 580 nm. El espectro indica que el hierro hemo en esta especie es d⁵_{1/2} con una molécula de oxígeno enlazada por uno de los átomos ocupando la sexta posición⁴.

La técnica de espectroscopía paramagnética electrónica (EPR) detecta electrones desapareados en una muestra por su absorción de energía de irradiación de microondas. Cuando la muestra se encuentra bajo un campo magnético fuerte, el espectro de EPR define completamente la configuración electrónica del átomo de hierro hemo. En el caso del compuesto III, no exhibe un espectro de EPR a baja temperatura, por lo tanto, parece ser diamagnético. Este fenómeno resulta de la proximidad de los dos átomos (el átomo de hierro hemo y el radical peroxil) escondiendo los electrones desapareados en la misma estructura con una cantidad finita de traslape electrónico entre ellos (acoplamiento antiferromagnético), indicando un equilibrio entre formas resonantes. Durante el decaimiento espontáneo del compuesto III, la señal en el espectro de EPR lentamente reaparece al alcanzar el estado nativo^{27,4}.

Vías de decaimiento del Compuesto III

El compuesto III puede seguir tres vías de decaimiento. En la primera, la inactivación se debe al potencial de esta especie reactiva para oxidar el anillo de porfirina. En la segunda vía, el compuesto III regresa al estado basal después de la oxidación. La tercera, es la liberación espontánea de un radical hidroperoxilo por el decaimiento unimolecular del compuesto III^{43,44} (Figura 18).

Hasta este momento, las hemoperoxidasas conocidas habían mostrado una alta sensibilidad a la desactivación con el peróxido de hidrógeno, lo que ha sido una limitante importante para sus potenciales aplicaciones biotecnológicas. A lo largo de la historia se han hecho diversos estudios de este fenómeno y se ha aplicado la ingeniería de proteínas buscando una mayor estabilidad, así como la purificación de nuevas hemoperoxidasas de diferentes fuentes, con estas características. A pesar de todos estos esfuerzos no se había logrado el diseño o purificación de una enzima con una estabilidad ante el peróxido de hidrógeno suficientemente alta para poder desarrollar todo su potencial. En un proyecto previo se realizó una búsqueda sistemática de alguna hemoperoxidasa estable a la inactivación con el peróxido de hidrógeno. En la gran variedad de isoformas presentes en la raíz de rábano japonés (*Raphanus sativus* L. var. Daikon) se identificó una isoforma estable al peróxido de hidrógeno, que se denominó Zo peroxidasa (ZoPrx), por la palabra griega Zo que significa permanente.

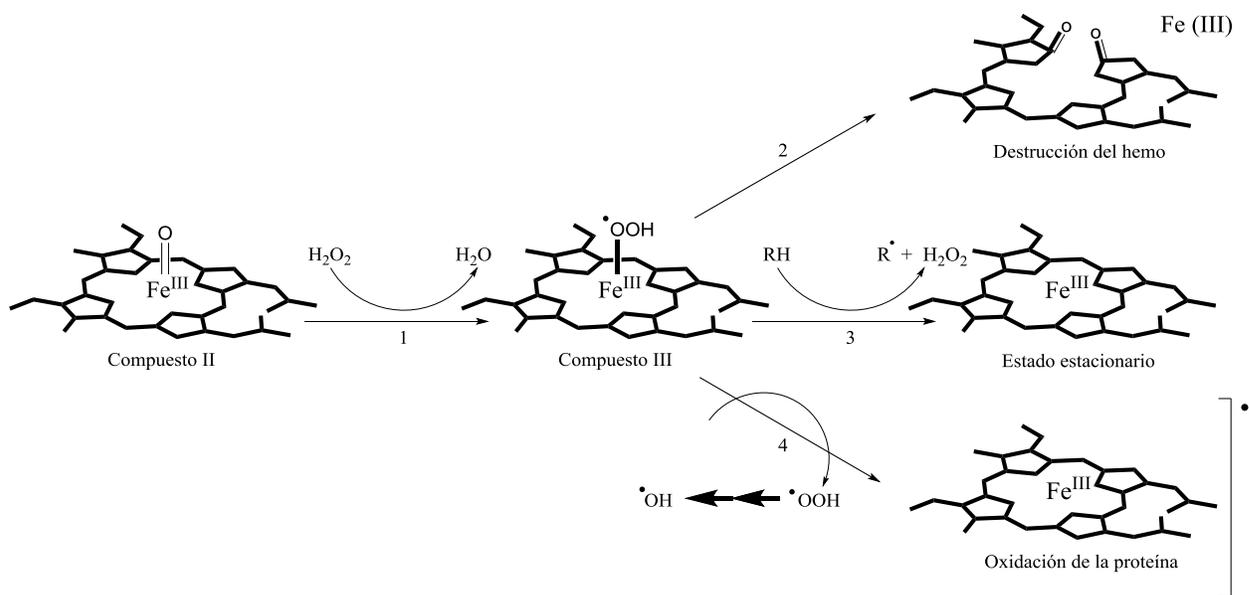


Figura 18. Mecanismo propuesto de inactivación por H_2O_2 de la Zo peroxidasa (tomado de Valderrama, et al., 2002)⁴³.

ANTECEDENTES

Tras la identificación de una isoforma de hemoperoxidasa llamada “ZoPrx” resistente a la inactivación por peróxido de hidrógeno en las raíces del rábano japonés, se realizó la caracterización bioquímica, que consistió en la valoración del efecto del peróxido de hidrógeno sobre la actividad catalítica, así como la secuenciación parcial por medio de espectrometría de masas⁴⁸.

La ZoPrx fue identificada como hemoperoxidasa por la presencia de una banda de absorción típica de las hemoperoxidasas a 403 nm con punto isoeléctrico a pH 6.1 y peso molecular de 47 kDa identificado por electroforesis no desnaturizante por la presencia de una única banda. La proteína pura, representa el 1.8 % de la actividad total de peroxidasa en el extracto de rábano⁴⁹.

De la espectrometría de masas se identificaron dos isoformas, y debido a que presentan propiedades fisicoquímicas similares, el mismo punto isoeléctrico, peso molecular y estabilidad al peróxido abre la posibilidad de que la presencia de dos especies se deba a diferencias de glicosilación de una misma isoforma⁴⁹. Con la secuencia de péptidos obtenidos experimentalmente por espectrometría de masas se realizó una búsqueda de posibles homólogos en la base de datos genbank, encontrando similitud con varias hemoperoxidasas, como las isoformas aniónicas ATP53 de *Arabidopsis thaliana* y HRP2 de *Armoracia rusticana* con las que se identificaron varias posiciones que forman parte del sitio catalítico⁴⁹:

- Arg38, ubicada en la parte distal del grupo hemo es parte fundamental para la catálisis, participando en la formación del compuesto I⁵⁰.
- His170, que coordina al grupo hemo del lado proximal²⁵.
- Phe180, que participa en la unión del sustrato reductor⁴¹.
- Cys177, que es una de las ocho cisteínas invariantes en las hemoperoxidasas de clase III.⁵¹
- Parte de la secuencia de aminoácidos que pertenecen a la región variable que comprende a la hélice F²⁰.

Debido a que no se observaron diferencias significativas entre las secuencias de los sitios activos de la ZoPrx y las peroxidasas lábiles HRP2 y ATP53, se sugirió que la estabilidad no estuviera determinada únicamente por los aminoácidos que forman parte del sitio activo. La estabilidad oxidativa de la ZoPrx fue evidenciada por los experimentos de cinéticas de inactivación a concentraciones catalíticas de peróxido de hidrógeno (1 mM) en ausencia de sustrato reductor. En estas condiciones, las ZoPrx mantuvo el 100 % de su actividad hasta por 150 minutos (Figura 19)^{48,49}.

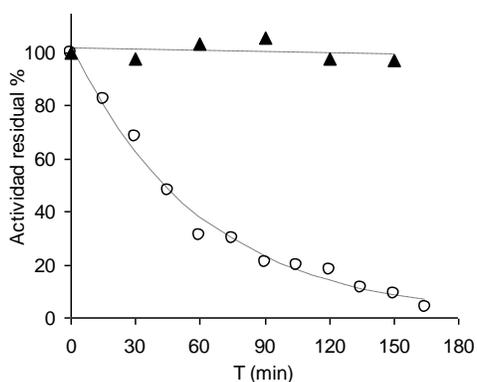


Figura 19. Cinética de inactivación de ZoPrx (Δ), HRP2 (\circ) incubando con 1 mM de H_2O_2 en ausencia de sustrato reductor en buffer fosfato pH 6.1, 60 mM⁴⁹. La grafica muestra la inactivación de la HRP2 en el tiempo y la actividad constante de la ZoPrx durante al menos 150 minutos.

El ciclo catalítico de las hemoperoxidasas fue visualizado mediante los desplazamientos en el espectro de absorción UV/vis. En particular, la destrucción de las porfirinas es muy evidente, ya que la banda del estado basal se desplazó al máximo característico del compuesto III (415 nm) y posteriormente decae en pocos minutos de manera irreversible (Figura 20a). En el caso de la ZoPrx, la incubación con 1 mM de H_2O_2 , el espectro presentó un comportamiento poco típico (Figura 20b), lo observado fue el desplazamiento de la banda Soret de 403 a 415 (característico del compuesto III), la cual se estabilizó por varias horas. Posteriormente esta especie se desplazó de nuevo a 403 nm (característico del estado basal). Esta especie final presentó la misma actividad de la preparación original⁴⁹.

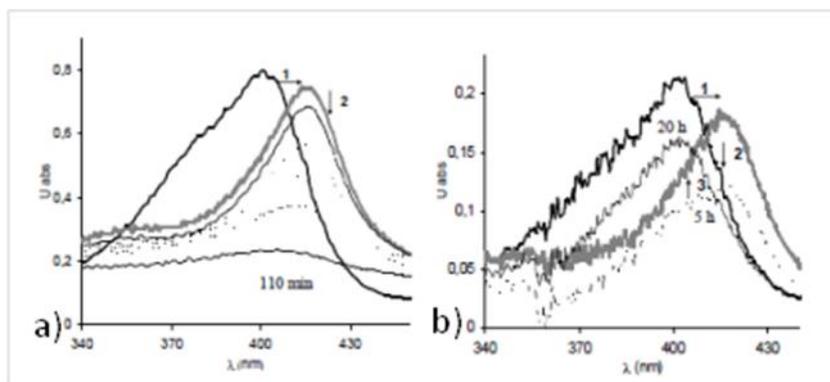


Figura 20. Monitoreo del espectro de la banda Soret de a) HRP A2, b) ZoPrx con 1 mM de H_2O_2 . Las flechas indican desplazamientos consecutivos de la banda Soret⁴⁹.

Al mezclar HRP A2 con un equivalente de peróxido de hidrógeno se observó una disminución de la señal de la banda a 403 nm y a 505 nm (características del compuesto I). Con la adición de 2 equivalentes de *p*-cresol (*p*-metilfenol) como sustrato reductor, la señal regresó al estado basal completando el ciclo catalítico (Figura 21a). Es posible que la ausencia del compuesto II se debiera a que la conversión ocurre en un tiempo menor al tiempo requerido para la detección en el espectro⁴⁹.

En la reacción de ZoPrx con 1 equivalente de H_2O_2 se observó la formación del compuesto I, muy similar al que se observó en la HRP A2. Al adicionarle 1 equivalente de *p*-cresol, el máximo de la banda Soret se desplazó a 418 nm, indicando la presencia del compuesto II. El ciclo fue completado con la adición de 1 equivalente más de *p*-cresol, regresando al estado basal (Figura 21b)⁴⁹.

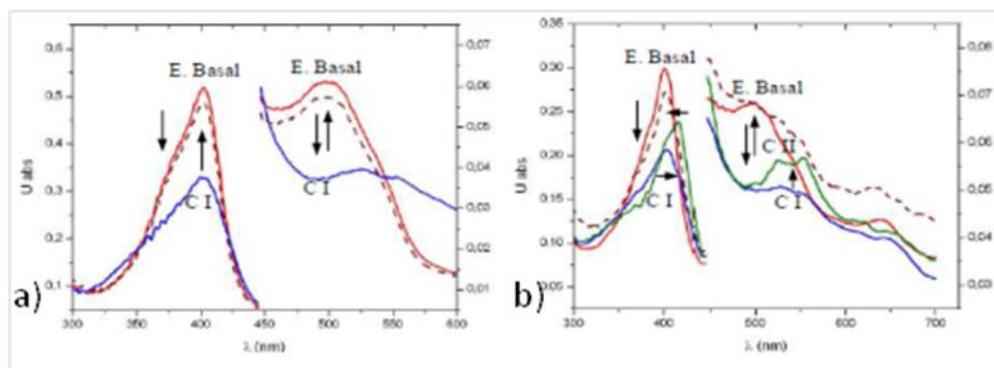


Figura 21. Monitoreo del espectro del ciclo catalítico de a) HRP A2, b) ZoPrx. Las flechas indican el desplazamiento consecutivo de la banda Soret con adiciones sucesivas de: 1) 1 equivalente de H_2O_2 , 2) y 3) 1 equivalente de *p*-cresol. La línea roja continua, indica el estado basal sin la adición de sustratos; la línea azul, la formación del compuesto I; la línea verde, formación de compuesto II; la línea roja discontinua, el regreso al estado basal después de haber completado el ciclo de reacción⁴⁹.

El compuesto III, que es un radical libre peroxi-ferril(III)porfirina, es altamente reactivo y puede llevar a las hemoperoxidasas a la desactivación por daño oxidativo al grupo hemo o a la proteína. Se ha observado que el compuesto III puede regenerar el estado basal de las enzimas mediante un sustrato reductor externo con la liberación de hidroperoxilo. En las hemoperoxidasas lábiles, aún cuando se detecta la liberación de hidroperoxilo, el decaimiento del compuesto III lleva siempre a la enzima a la desactivación. En la ZoPrx, se observó que como consecuencia a la exposición del estado basal a exceso de peróxido de hidrógeno, el compuesto III decayó al estado basal sin llevar a la enzima a la inactivación, lo que sugiere que la capacidad de este intermediario en la ZoPrx para oxidar al anillo de porfirina o a los aminoácidos está limitada, decayendo probablemente con la liberación directa del radical hidroperoxilo sin causar daño a la proteína.

En las peroxidasas como la HRP2 y la ZoPrx, por su alto potencial redox, los compuestos I, II y III, son capaces de oxidar, además de un sustrato externo, al anillo de porfirina y a los aminoácidos de la proteína, principalmente a los residuos de menor potencial redox como metioninas, triptófano, cisteínas y tirosinas⁵². En la ZoPrx, en el supuesto caso de tener una menor capacidad oxidante, es posible que su capacidad de dañar a la porfirina y los residuos de la proteína también esté disminuida, resultando en una mayor estabilidad.

Además del potencial redox, son múltiples los factores que intervienen en la transferencia de electrones necesaria para formar cada uno de los intermediarios del ciclo catalítico y del compuesto III. Aún más, se requiere explicar el mecanismo de regeneración del estado basal en exceso de peróxido de hidrógeno sin llegar a la inactivación.

La topología del sitio catalítico, así como los sitios de unión de los sustratos, la disociación del grupo funcional, las interacciones electrostáticas, etc., son algunos de los factores que podrían contribuir fuertemente a que la ZoPrx presente alta estabilidad ante el peróxido de hidrógeno.

La secuencia de la ZoPrx, fue obtenida parcialmente (104 residuos de aminoácidos) por secuenciación realizada de dos lotes de proteína purificada en el 2008 y 2010. El resto de la secuencia fue obtenido por ajuste manual del modelo estructural sobre el mapa de densidad electrónica (la estructura cristalográfica de rayos X fue obtenida a una resolución de 2.05 Å). Así, sólo 24 de los 308 residuos presentes en la proteína pueden variar (marcados)³⁴ (Figura 22).

```

          10          20          30          40          50          60
ZO-PRX GGSLNATFYAGTCPNASAMVRTIVQQAFQSDSRIGASLIRLHFHDCFVLCAVILLDNS
          Hélice A                    Hélice B

          70          80          90          100         110         120
ZO-PRX GSTSEKNAGPNANSARGFNVVDNIKTALENACPGVVSCTDVLALASQASVSLSGGPSWT
          Hélice-B'                    Hélice C                    Hélice D

          130         140         150         160         170         180
ZO-PRX VDLGRRDLTANQAGANSSIPSPTQGLSNITSKFSAVGLNTNDLVALSGARTFGRATCGV
          Hélice D'                    Hélice E                    Hélice F

          190         200         210         220         230         240
ZO-PRX FSNRLFNFSGKGNPDPTLNTTLLSTLQELCPQKGRGSGSTNLDLSTPDAFDNNYFTNLQS
          Hélice F''                    Hélice G

          250         260         270         280         290         300
ZO-PRX NGLLQSDQELFSTTGSATIAIVTSFASNQTLFFQAFAQSMINMGNISPLTGSSGEIRLD
          Hélice H                    Hélice I                    Hélice J

          308
ZO-PRX CKKTNGSG

```

Figura 22. Secuencia completa de la ZoPrx. Los residuos en color son los que se obtuvieron en dos secuenciaciones realizadas, 2008 (amarillo) y 2010 (verde). Los residuos en rojo fueron cambiados durante el ajuste manual sobre la densidad electrónica, y que difirieron de los residuos asignados en las secuenciaciones. Los residuos en magenta son aquellos que se modelaron según el consenso con las secuencias de homólogos. En morado se destaca la histidina proximal perteneciente al sitio activo, en naranja las 8 cisteínas que forman los cuatro puentes disulfuro y en azul los residuos de unión a Ca^{2+} .³⁴

HIPÓTESIS

La resistencia a la desactivación en presencia de peróxido de hidrógeno de la Zo peroxidasa proviene de las características electrónicas del sitio activo.

OBJETIVOS:

Optimización del método de purificación de la Zo peroxidasa a partir del extracto de nabo blanco.

Caracterización por EPR de la ZoPrx en presencia de diferentes equivalentes y exceso de peróxido de hidrógeno, para identificar el espectro de la forma nativa de la enzima, así como también, la formación del compuesto I y el intermediario formado por la enzima en presencia de exceso de peróxido de hidrógeno.

METODOLOGÍA:

Purificación

Se utilizaron 145 kg de nabo blanco o rábano japonés (divididos en tres lotes) obtenidos de un mercado local; se mantuvieron en agua durante la noche, previo a la extracción. Al día siguiente, se procesaron con un extractor común para obtener el jugo del rábano. El extracto fue equilibrado con buffer fosfato de sodio (BPS) 1M pH 6.1 para ajustar el pH y obtener una concentración final de 10 mM de BPS. El mismo día se centrifugó en línea a 14,000 g por 20 minutos y se concentró por ultrafiltración en una celda Amicón de 100 kDa. El concentrado, luego de este paso, se centrifugó por periodos de 20 minutos a 10,000 rpm y se continuó la concentración en una celda Amicón de 10 kDa del que se obtuvieron 1.1 L de líquido.

Con este concentrado se inició la purificación por cromatografía en una resina de intercambio catiónico, Macro-Prep High S (Bio-Rad). La columna se preparó con NaCl 1M en BPS 10 mM pH 6.1 y posteriormente se equilibró con BPS 10 mM pH 6.1, a continuación se inyectó el extracto a flujo de 2 ml/min. Una vez eluido todo el extracto se lavó la columna con BPS 10 mM pH 6.1 hasta recuperar todo lo que no se pegó y que contiene a la ZoPrx y finalmente la fracción que es retenida en la columna fue recuperada con NaCl 1 M en BPS 10 mM pH 6.1 .

En el siguiente paso de purificación, la fracción no retenida en la columna del paso anterior se cargó en una resina de intercambio aniónico Macro-Prep High Q (Bio-Rad) previamente equilibrada con buffer BPS 10 mM pH 6.1. Se obtuvieron dos fracciones, la primera no se retuvo por la columna y contenía a la ZoPrx y una más que sí se retuvo. La fracción que fue retenida se recuperó eluyendo con NaCl 1 M en BPS 10 mM pH 6.1.

Una vez que se eluyó el volumen total, la fracción no retenida por la resina se concentró en una celda Amicón con una membrana de corte de 10 kDa con presión de 1.5 Psi (libra-fuerza por pulgada cuadrada, por sus siglas en inglés), para posteriormente dializarla con 10 volúmenes de buffer acetatos 20 mM pH 4.5 durante la noche a 4 °C. Al día siguiente se cargó este volumen en una resina de intercambio aniónico débil, Macro-Prep CM (carboximetil celulosa de Bio-Rad) previamente equilibrada con buffer de acetatos a un

flujo de 2 ml/min. La fracción retenida en la columna fue eluida con NaCl 1 M en buffer acetatos 20 mM pH 4.5.

La fracción que no se retuvo en la resina y que contenía a la ZoPrx se colectó y se dializó durante la noche en 10 volúmenes de BPS 100 mM pH 6.1. Posteriormente se llevó a saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y a continuación se cargó a una resina de interacción hidrofóbica, Macro-Prep t-Butyl HIC (Bio-Rad) que se equilibró con una solución de sulfato de amonio saturada en BPS 100 mM pH 6.1. La preparación se eluyó con un gradiente lineal descendiente de la misma sal de amonio saturada hasta 0 M. Las fracciones que contenían a la ZoPrx se colectaron y se dializaron en 10 volúmenes de buffer BPS 100 mM pH 6.1 para posteriormente concentrarse en Amicón utilizando una membrana de corte de 10 kDa. La fracción concentrada en el paso anterior fue cargada en una columna de permeación en gel Shephadex G-75 (GE) previamente equilibrada con BPS 100 mM pH 6.1 preparado en agua tetra destilada; la fracción fue eluida con el mismo buffer y concentrada en centricones con membranas de corte de 50 kDa.

El seguimiento de la actividad durante la purificación fue hecho monitoreando la capacidad de las alícuotas de oxidar guayacol (*o*-Metoxifenol) 16 mM ($26.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) como sustrato y H_2O_2 10 mM en 1 ml de buffer BPS 60 mM pH 6.1. Para seleccionar las fracciones con mayor estabilidad al peróxido, se realizaron pruebas de incubación por 1.5 horas con 10 mM de H_2O_2 y se detectó la actividad residual usando guayacol 16 mM como sustrato reductor en BPS 60 mM pH 6.1. Solamente aquellas fracciones con actividad de oxidación de guayacol resistente al peróxido fueron colectadas para procesamiento posterior.

Para determinar la pureza de la fracción final se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes, en geles de poliacrilamida al 12 % y fue revelado en un fotodocumentador Bio-Rad.

Estabilidad de ZoPrx ante H_2O_2

La estabilidad de la peroxidasa ante H_2O_2 se evaluó mediante el seguimiento de la cinética de inactivación en una mezcla de reacción ZoPrx (4.2×10^{-5} M) incubando en presencia de peróxido de hidrógeno 10 mM de buffer fosfato de sodio 60 mM pH 6.1 (en un volumen final de 1 ml). A tiempos determinados se tomaron alícuotas de la mezcla y su actividad

residual fue estimada con la medición de la velocidad inicial de la oxidación de guayacol 16 mM y H₂O₂ 10 mM en BPS 60 mM pH 6.1 en un volumen final de 1 ml.

Cuantificación de la proteína

La concentración de la proteína fue estimada por el método Bradford; se utilizó reactivo de Bradford 5X (Bio-rad), H₂O mili-Q (MQ) y una dilución de proteína 1:500 (proteína: H₂O). Las mediciones fueron realizadas en una celda de plástico de 1 cm en un espectrofotómetro a 595 nm (UV Lambda 900 Perkin Elmer Instruments utilizando el software UV WinLab L800/L900 Ver 3.00.03). El blanco para esta determinación fue preparado con 200 µl de Bradford más 800 µl de H₂O MQ. Las muestras se prepararon por triplicado con 200 µl de Bradford, 100 µl de la dilución de proteína y 700 µl de H₂O MQ. La cuantificación se realizó contra una recta patrón elaborada con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina entre 0.1 y 0.9 µg/ml, con una pendiente de 0.0651 y un índice de correlación lineal de R=0.99693.

Preparación de las muestras para caracterización de ZoPrx por EPR

Los espectros de EPR en banda X se registraron en el laboratorio de la Universidad de Siena en el departamento de Química con un espectrómetro Bruker E500 X-Band Elexis. Las mediciones de baja temperatura se realizaron con un criostato ESR900 Oxford Instruments que trabaja en el intervalo de temperaturas 3-300 K

Las soluciones para los espectros EPR se prepararon *in situ*, se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido y se insertaron en el criostato inmediatamente. Los espectros fueron obtenidos para las reacciones de la proteína contra diferentes relaciones molares de H₂O₂ y a diferentes temperaturas a pH 6.1.

Para la obtención del espectro de EPR de la ZoPrx nativa se utilizaron 150 µl de proteína de concentración 0.09 mM en BPS 60 mM a pH 6.1 y el registro se realizó a 5 K. La proteína fue colocada en un capilar de cuarzo, con ayuda de una pipeta Pasteur, mismo que fue colocado en nitrógeno líquido inmediatamente antes de la medición.

Para los espectros de EPR de las reacciones con peróxido de hidrógeno se prepararon soluciones de H₂O₂ para las diferentes relaciones molares; se usaron 150 µl de proteína de concentración 0.09 mM y el registro se realizó a 4-5 K.

Los experimentos realizados en EPR se resumen en la tabla 2 indicándose las condiciones de reacción (temperatura y relaciones molares):

Tabla 2. Resumen de preparaciones para caracterización por EPR.

Experimento	T (K)	[Z _o Prx] (M)	[H ₂ O ₂] (M)	Z _o Prz:H ₂ O ₂
1	5	8.4x10 ⁻⁵	-	-
2	4	8.4x10 ⁻⁵	1.3x10 ⁻³	1:1
3	4	8.4x10 ⁻⁵	1.1x10 ⁻²	1:8
4	4	8.4x10 ⁻⁵	0.13	1:100
5	4	8.4x10 ⁻⁵	1.3	1:1,000
6	4	8.4x10 ⁻⁵	13.5	1:10,000

Los capilares que contenían las reacciones de relación molar: 100, 1:1,000 y 1:10,000 se almacenaron a 4 °C durante 72 horas para analizar el restablecimiento del estado basal mediante el registro de sus espectros.

RESULTADOS

Purificación

Se extrajo el jugo de tres lotes de rábano japonés de 50 kg cada uno, obteniéndose aproximadamente 30 litros de jugo en cada lote. Mediante tres pasos de cromatografía de intercambio iónico, uno de interacción hidrofóbica y un refinado por permeación en gel, se obtuvieron 8.755 mg de proteína pura ZoPrx, misma que presentó una estabilidad aproximada del 70 % de su actividad residual en presencia de 10 mM H₂O₂ utilizando guayacol 16 mM como agente reductor.

Otra manera de identificar a las hemoperoxidasas además de su estabilidad/actividad residual es mediante su espectro UV, en el que se detecta una banda de absorbancia con un máximo en 400 nm, conocida como banda Soret, típica de las hemoperoxidasas. La ZoPrx presentó específicamente un máximo a 403 nm (Figura 23) con un Rz de 3.3 (relación entre el valor de absorbancia en la banda Soret y la absorbancia a 280 nm, longitud de onda a la que absorben las proteínas). Este valor es intrínseco de cada hemoperoxidasa y sirve como parámetro indicador para evaluar el grado de pureza de las proteínas.

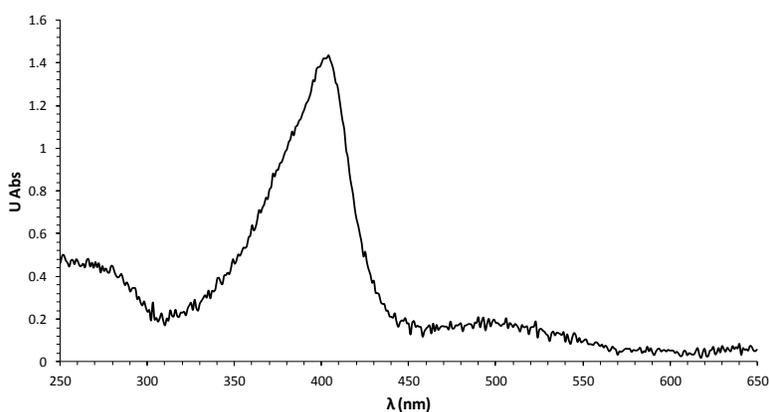


Figura 23. Banda Soret ZoPrx.

La ZoPrx analizada por electroforesis en condiciones desnaturizantes se identificó como una doble banda, con peso molecular alrededor de 47 kDa. Esta doble banda muy probablemente es debida a la presencia de isoformas a diferencias en el patrón de glicosilaciones de la misma proteína.

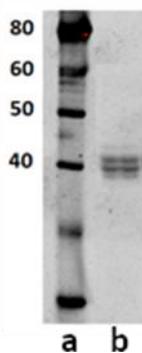


Figura 24. Electroforesis, carril a) marcador de peso molecular, carril b) ZoPrx.

Caracterización por EPR de la ZoPrx

Experimentos con H₂O₂

El espectro de la forma nativa de la proteína fue adquirido a 5 K y mostró un típico Fe(III) de alto espín con señales en valores de $g=6.03$ y 1.99 (Figura 25)⁵³.

Los valores de g a 5.74 , 5.43 , 4.64 y 3.21 pueden deberse a la presencia de la forma de espín cuántico mixto, estados férricos de alto espín (QM: $S=3/2$ y $S=5/2$) (Figura 25)^{54,55}.

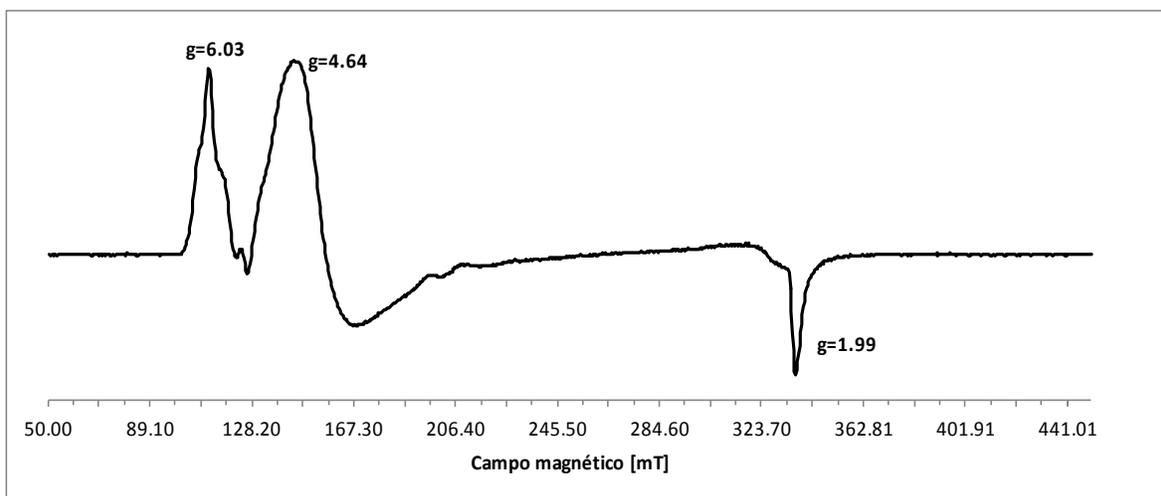


Figura 25. Espectro de EPR a 5K de la ZoPrx, especie nativa. El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.4 mT; potencia, 2mW; frecuencia de modulación, 100 kHz.

Con el objetivo de obtener el espectro del compuesto I, se preparó una reacción con relación 1:1 ZoPrx:H₂O₂, y el espectro fue adquirido a 4 K; sin embargo, no se observó cambio físico en la reacción y no se obtuvo cambio significativo en el espectro,

observándose prácticamente las mismas señales que en el espectro de la forma nativa, tanto del Fe(III) de alto espín como las señales de QM (Figura 26).

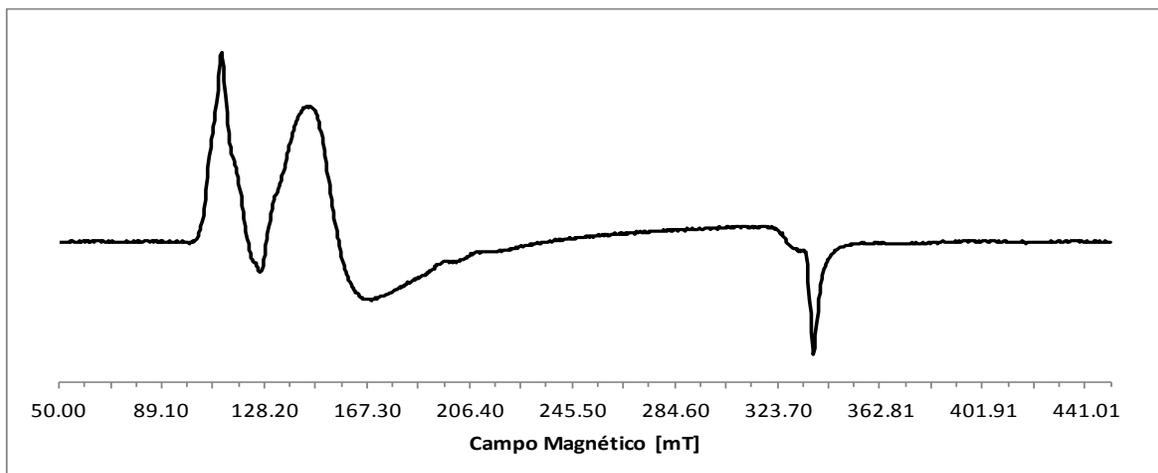


Figura 26. Espectro de EPR a 4K de la ZoPrx en reacción 1:1 ZoPrx:H₂O₂. El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.4 mT; potencia, 2mW; frecuencia de modulación, 100 kHz

Posteriormente, se adquirió el espectro de la reacción, aumentando la relación ZoPrx:H₂O₂ a 1:8 obtenido a 4 K. En este caso se observó un cambio de color en la reacción, pasando de rojo a verde, y se obtuvieron valores típicos de g de un radical π catión a 2.7 y 1.99⁵⁶. Las señales del hierro que se observaron en el espectro de la especie nativa se perdieron completamente y la formación del radical reconocido como compuesto I fue total (Figura 27).

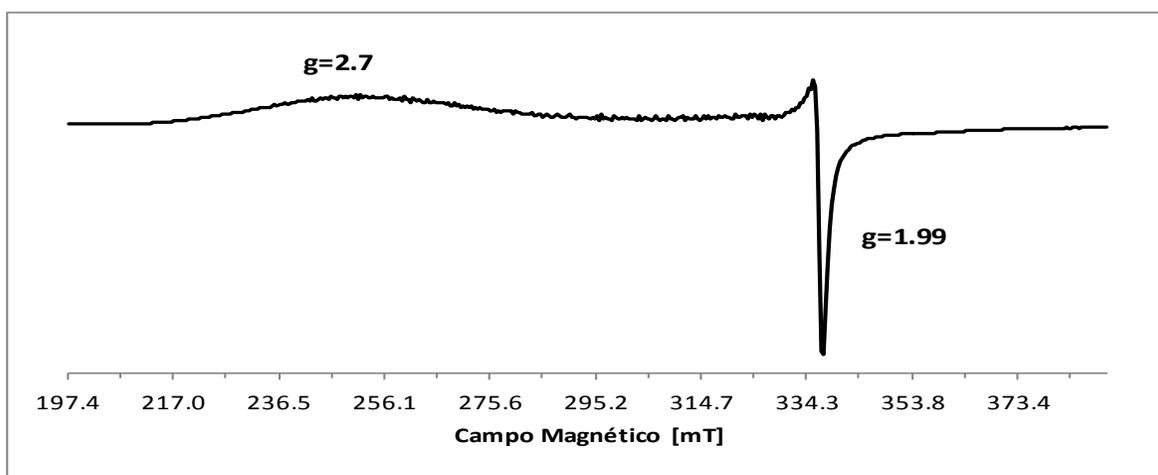


Figura 27. Espectro de EPR a 4 K del compuesto I formado en la reacción 1:8 ZoPrx:H₂O₂. El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.4 mT; potencia, 2mW; frecuencia de modulación, 100 kHz.

Sabiendo que el compuesto II, descrito para el mecanismo de las hemoperoxidasas se trata de un compuesto paramagnético (silenciosos en EPR) se prepararon reacciones en exceso de peróxido de hidrógeno, esperando reconocer un cambio en las señales del espectro, posiblemente el compuesto III, que según la literatura, se genera bajo estas condiciones. En los espectros de las reacciones con relación ZoPrx:H₂O₂ 1:100 y 1:1,000, adquiridos 4 K, se observó un cambio de color en la solución una vez agregado el peróxido de hidrógeno, de rojo a verde, reconocido en el experimento de relación 1:8 aunque el espectro en ambos casos corresponde a la formación del compuesto I lo que sugiere que la relación 1:100 y 1:1,000 no corresponde a un exceso suficiente de peróxido de hidrógeno.

A continuación, se preparó un experimento con mayor concentración de peróxido de hidrógeno, en una relación ZoPrx:H₂O₂ 1:10,000 también a 4 K. Tal como puede verse en la figura 29, bajo estas condiciones el espectro obtenido es diferente al del compuesto I con las siguientes características:

El valor de g a 4.3 es típico de Fe libre, lo que sugiere la posibilidad de la parcial destrucción de la proteína ante el exceso de peróxido. Las valores de g en las pequeñas señales a 6 y 2 corresponden a Fe(III) de alto espín, lo que sugiere una posible restauración del estado basal. Además, por el tamaño de la señal en 2, podría indicar la presencia de un radical en solución (Figura 28).

La señales en 2.57, 2.18 y 1.85 son características de Fe(III) bajo espín, lo que podría indicar la presencia de un ligante hidroxilo unido al hierro hémico (Figura 28)⁵⁷.

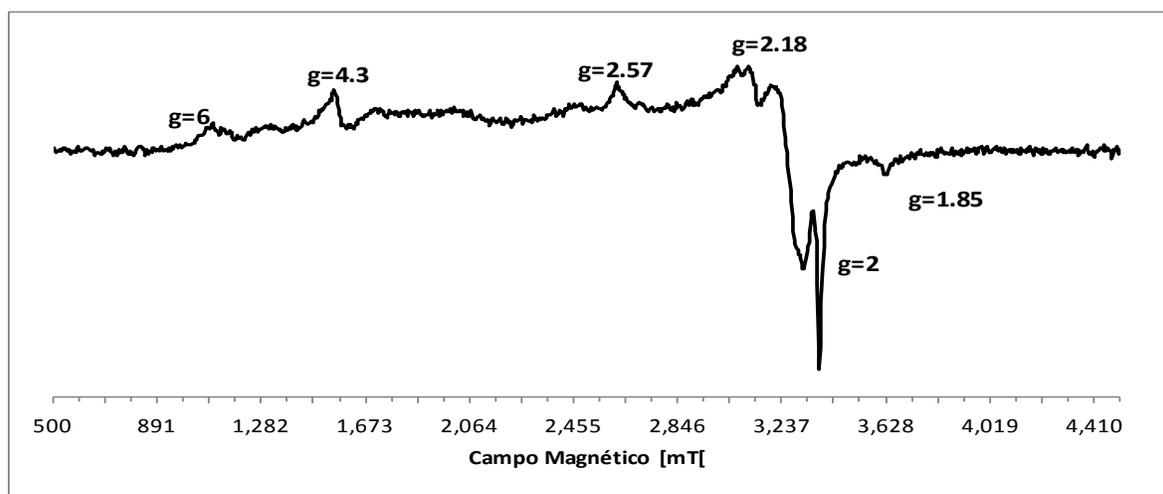


Figura 28. Espectro de EPR a 4 K en la reacción 1:10,000 ZoPrx:H₂O₂. El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.4 mT; potencia, 2mW; frecuencia de modulación, 100 kHz.

Experimentos de reacciones incubadas por 72 horas

Las reacciones realizadas con relaciones ZoPrx:H₂O₂ de 1:100, 1:1,000 y 1:10,000 se almacenaron a 4 °C durante 72 horas, luego de este tiempo, se observó que las mezclas de reacción adquirieron un color muy parecido al de la proteína pura, por lo que se retomaron para identificar algún cambio en el espectro o el restablecimiento del estado basal.

Los espectros de las tres reacciones, 1:100 a 17K , 1:1,000 a 21 K y 1:10,000 a 18 K, presentaron prácticamente las mismas señales (Figura 29), en los tres espectros se observaron señales con valores de g características del estado basal de la ZoPrx nativa en g=6.2 y 2, por lo que es posible sugerir una restauración parcial del mismo. Sin embargo, el espectro mostró también un señal pequeña con g=4.3, relacionada con hierro en solución o hierro libre (posible degradación de la proteína). Cabe señalar que el rango de temperaturas 17-21 K no es ideal para la obtención de la señal del Fe(III) del estado basal, y es probable que en mejores condiciones de temperatura, es decir, temperatura más baja (4-5 K) se observe una mejor forma de las señales.

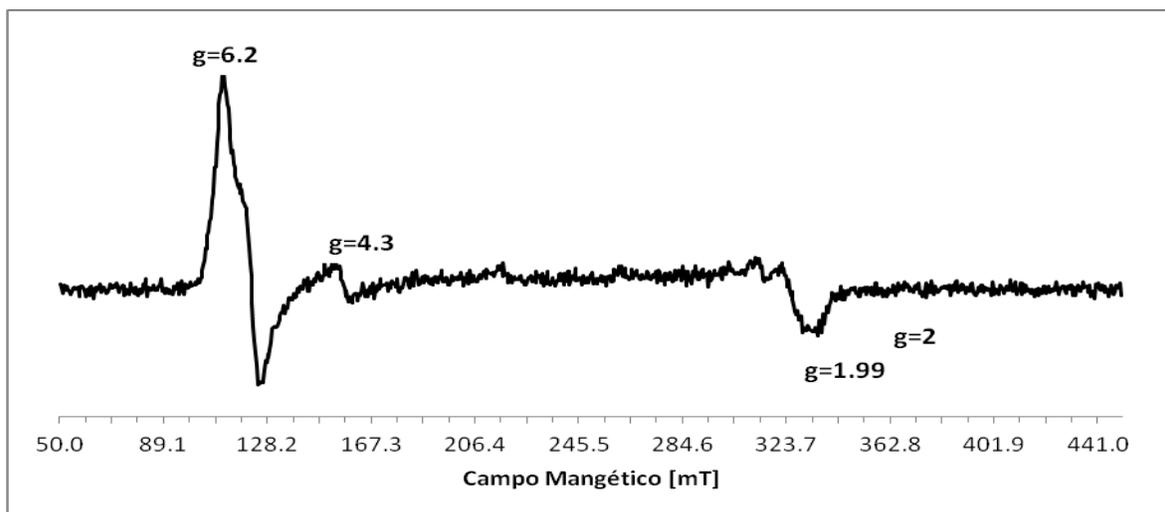


Figura 29. Espectro a 18 K de la ZoPrx en presencia de peróxido de hidrógeno en relación 1:10,000 registrado después de 72 horas El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.4 mT; potencia, 2mW; frecuencia de modulación, 100 kHz.

DISCUSIÓN

En la primera parte este trabajo se realizó la purificación de la ZoPrx, a partir del rábano japonés (nabo blanco). La obtención de la proteína fue seguida a lo largo de la purificación a través de ensayos de actividad y estabilidad de las fracciones obtenidas en cada paso, los cuales consisten en la incubación de la peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno y guayacol como sustrato reductor, que permiten discriminar las fracciones de baja estabilidad. Además de alta estabilidad al peróxido, la preparación se identificó también por su espectro característico de absorción de la banda Soret a 403 nm, ya que se trata de una hemoproteína. En electroforesis desnaturante la proteína pura se detectó como una doble banda de peso molecular de 47 kDa que coincide con la reportada previamente^{48,49}.

A pesar de que el protocolo de purificación fue establecido y probado previamente, fue necesario realizar adecuaciones al mismo entre lotes, lo cual sugiere cierta diversidad en las propiedades fisicoquímicas de la proteína posiblemente influenciadas por el entorno en que se producen los rábanos y que no son controlables desde el laboratorio: condiciones climáticas, nutrientes en la tierra, cambios estacionales, entre otros factores. Sin embargo, con el monitoreo basado en estabilidad es posible identificar la proteína y purificarla con seguridad, ya que sus características espectroscópicas son siempre las mismas.

De la caracterización por EPR, la especie nativa de la ZoPrx muestra al grupo hemo en una mezcla de estados de espín, en el se pudieron identificar señales a $g=5.74$, 5.43 , 4.64 y 3.43 (QM= $S=3/2$ y $S=5/2$), así como señales de alto espín (HS, $S=5/2$) en $g= 6.03$ y 1.99 (Figura 30), consistente con espectros reportados para otras peroxidases de clase III reportadas, por ejemplo, la peroxidasa de cebada, isoenzima 1 (BP 1, por sus siglas en inglés), que a baja temperatura muestra señales de HS en $g=5.84$ y 1.98 y QM a $g=5.66$ a pH 4.0, mientras que a pH 6.5, se conservó la señal de HS en $g=1.96$ y se reconocen señales en 5.36 , 3.75 y 1.9 correspondientes a la mezcla de espines⁵³⁻⁵⁵ (Figura 31).

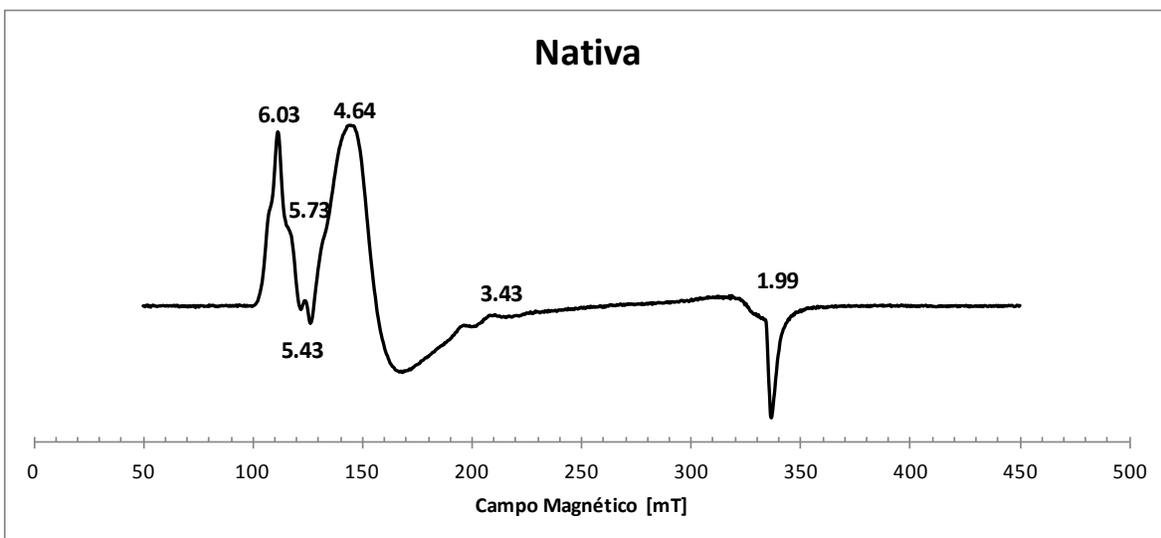


Figura 30. Espectro de EPR a 5K de la ZoPrx, especie nativa. El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.4 mT; potencia, 2mW; frecuencia de modulación, 100 kHz.

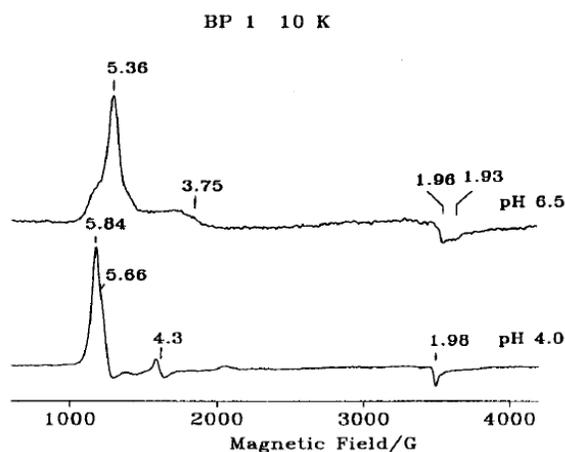


Figura 31. Espectro de EPR de la peroxidasa de cebada (BP1) 100 μ M a 10 K pH 4.0 y 6.5. El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.68 GHz; amplitud de modulación, 10 G; potencia, 2mW; frecuencia de modulación, 100 kHz (tomado de Howes et al. 1999)⁵⁵.

A partir de la enzima nativa usando una relación molar ZoPrx:H₂O₂ de 1:8 se obtuvo la formación de un típico compuesto I característico de peroxidasa de clase III, con valores de g de un radical π catión asociado a la porfirina con g=2.7 y 1.99 (Figura 32), completamente diferente del espectro de la enzima nativa (Figura 25). Los valores de g obtenido en el espectro son comparables y consistentes con los reportados en la literatura, como es el caso de la formación de compuesto I a partir de la reacción de la enzima ascorbato peroxidasa (APX), frente a 1.1 equivalentes de peróxido de hidrógeno, en el que

se distingue la clara formación del compuesto I por obtención de las señales en $g=3.27$ y 1.99 ⁵⁶ (Figura 33); señales con desplazamientos similares se han observado para en la reacción de citocromo *c* peroxidasa⁵⁶.

Usando relaciones molares ZoPrx:H₂O₂ de 1:100 y 1:1,000 el espectro obtenido fue el del compuesto I, sugiriendo que el exceso de peróxido de hidrógeno no fue suficiente para generar diferencias en las señales del espectro, y además sirvió como indicio de la alta estabilidad por su resistencia a concentraciones tan altas de peróxido.

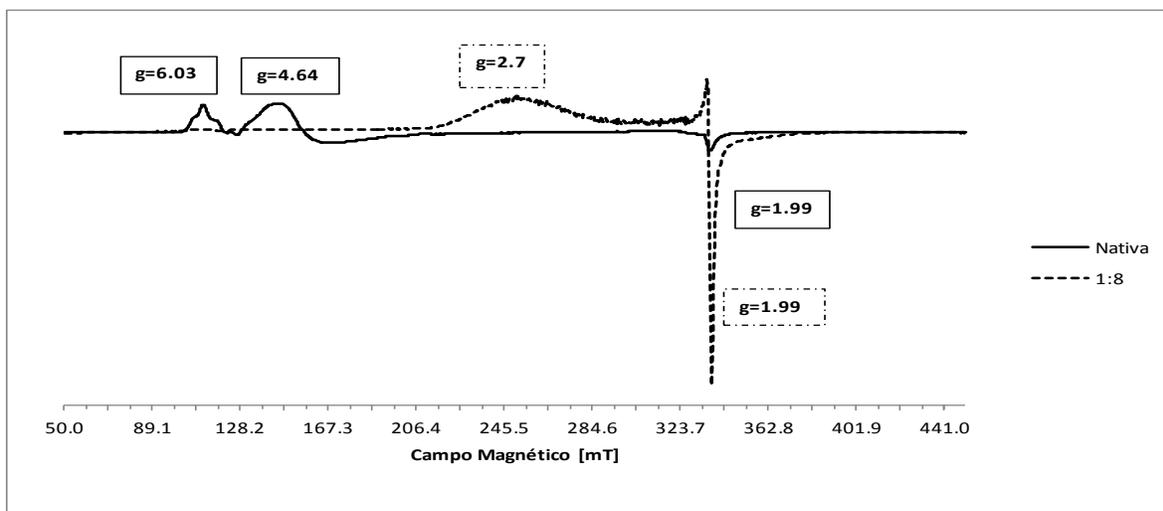


Figura 32. Espectro a 5 K de la ZoPrx nativa (línea sólida) y a 4 K de la relación 1:8 ZoPrx:H₂O₂ (línea punteada). El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.4 mT; potencia, 2 mW; frecuencia de modulación, 100 kHz.

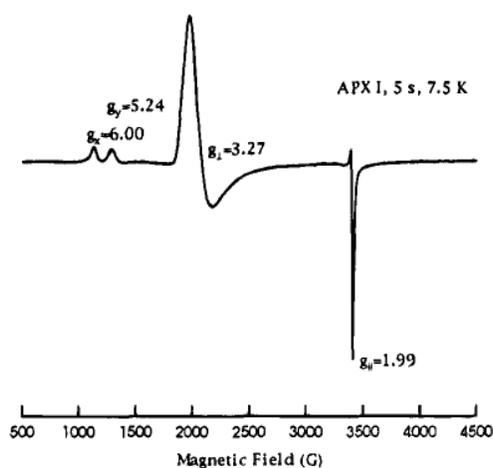


Figura 33. Espectro de EPR del compuesto I de APX 0.16 mM a 7.5 K pH 7. El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.52 GHz; amplitud de modulación, 10.4 G; potencia, 20 mW; frecuencia de modulación, 100 kHz (tomado de Patterson et al. 1995)⁵⁶.

El descubrimiento más relevante de este trabajo fue la caracterización del compuesto formado en condiciones de exceso de peróxido, equivalentes a una relación enzima:H₂O₂ de 1:10,000, bajo las que se esperaba por ausencia de la señal, identificar la formación del compuesto III, mismo que no es activo en EPR, ya que se trata de una especie “diamagnética”, debido al equilibrio teórico sugerido en la literatura para esta especie, mismo que se presenta entre la especie oxihemo, que descrita como un átomo de oxígeno de una molécula de dioxígeno enlazado a un hierro de bajo espín (Fe^{II}-O₂) y un radical superóxido antiferromagnéticamente acoplado a un hierro de bajo espín (Fe^{III}-O₂^{•-})^{27,58}.

En la enzima modelo HRP2 a pH 6.1 y 4 K, el compuesto III reportado presentó únicamente la señal en 4.3 (hierro libre), y por ausencia de las señales es consistente con el paramagnetismo propuesto en la literatura; el espectro que se recuperó después de incubación por 20 h reflejó fielmente, aunque con menor intensidad, al de la especie nativa (Figura 34).

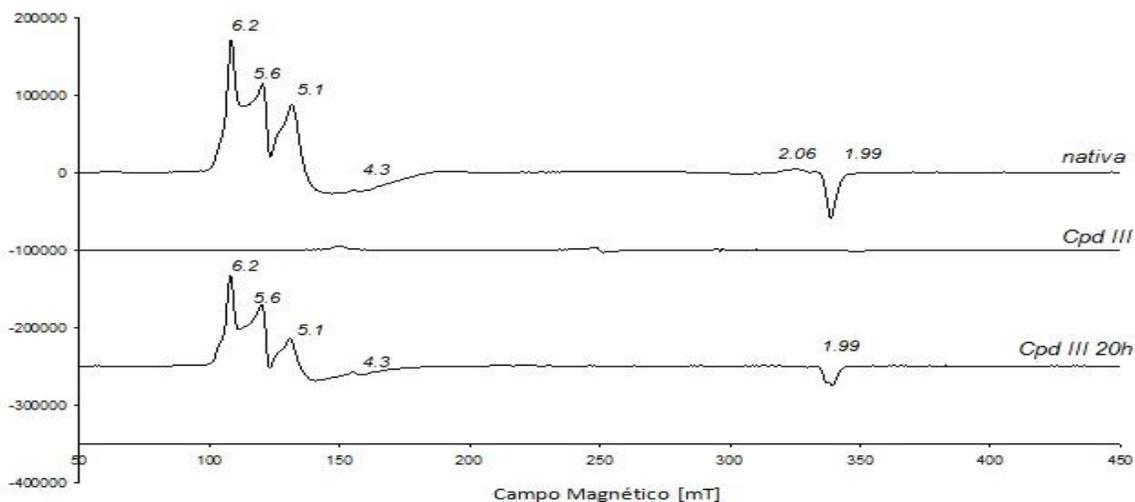


Figura 34. Espectro de HRP2 0.2 mM pH 6.1 a 4 K. El espectro fue adquirido antes de la adición de exceso de peróxido, estado basal (espectro superior); después de la incubación por dos minutos, compuesto III (espectro intermedio); y después de 20 horas incubación, decaimiento compuesto III (espectro inferior). 9.39 GHz²⁷.

En ZoPrx, las señales observadas fueron claramente diferentes y sugieren la formación de una especie de Fe(III) de bajo espín con la presencia de un ligante hidroxilo unido al hierro hémico ($g=2.57, 2.18$ y 1.85)^{57,59} como muestra la figura 36. Este espectro no ha sido nunca relacionado con el compuesto III, sin embargo, sí existen referencias en la literatura para

otras hemoproteínas no-enzimáticas como son la met-mioglobina y la hemoglobina, en las cuales el hierro se encuentra hexacoordinado por un grupo hidroxilo^{57,59}.

Este espectro presenta otras señales menos intensas que se interpretaron como hierro libre ($g=4.3$) y la recuperación parcial del estado estacionario con el Fe(III) de alto espín ($g=6$ y 2), aunque por el tamaño en la señal de $g=2$ podría tratarse también de un radical en solución (Figura 35), sugiriendo así, la presencia de posibles especies producto de la degradación de la proteína.

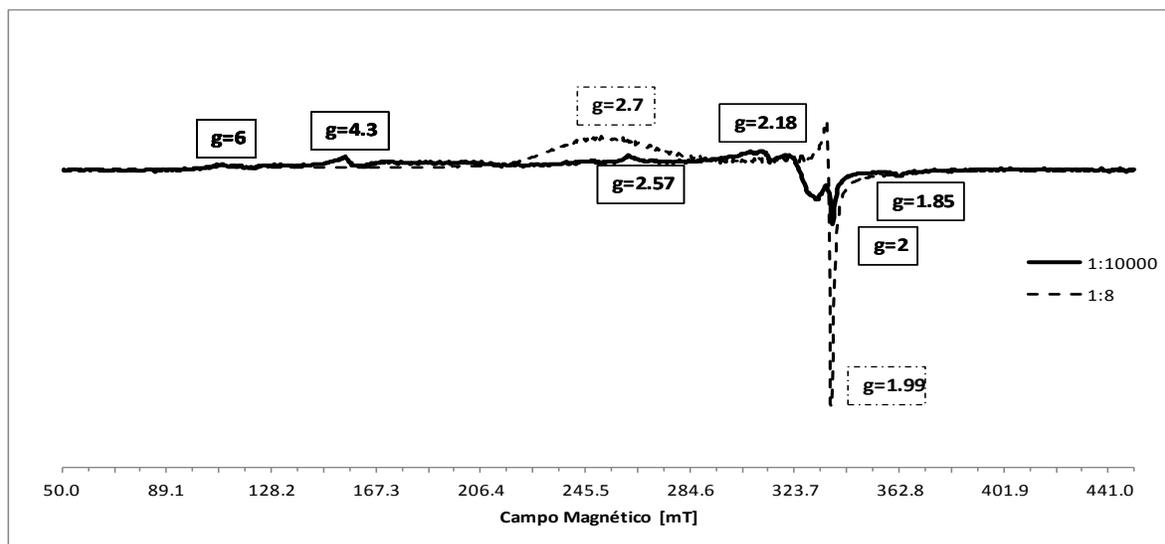


Figura 35. Espectro a 4 K de la relación 1:8 ZoPrx:H₂O₂ (línea punteada, espectro normalizado) y 1:10,000 (línea continua). El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.4 mT; potencia, 2 mW; frecuencia de modulación, 100 kHz.

El decaimiento de las señales obtenidas en el espectro de la reacción 1:10,000, luego de 72 horas evolucionó a señales consistentes con el estado basal ($g=6.2$ y 2) y una señal a $g=4.3$ asignada a hierro en solución, aunque no en la misma proporción. Esto es consistente con los datos obtenidos por el grupo en cuanto a la recuperación de actividad residual así como señales espectroscópicas en UV-Vis y dicroísmo circular, donde la recuperación es prácticamente completa^{48,49}. Cabe señalar, que la adquisición del espectro luego de 72 horas fue a una temperatura distinta, 18 K, mientras los espectros de la especie nativa y la reacción 1:10,000 fueron obtenidas a 5 y 4 K respectivamente (Figura 36), si bien 18 K no fue la temperatura óptima para registrar un espectro de la enzima, fue posible distinguir la regeneración del estado basal (Figura 37).

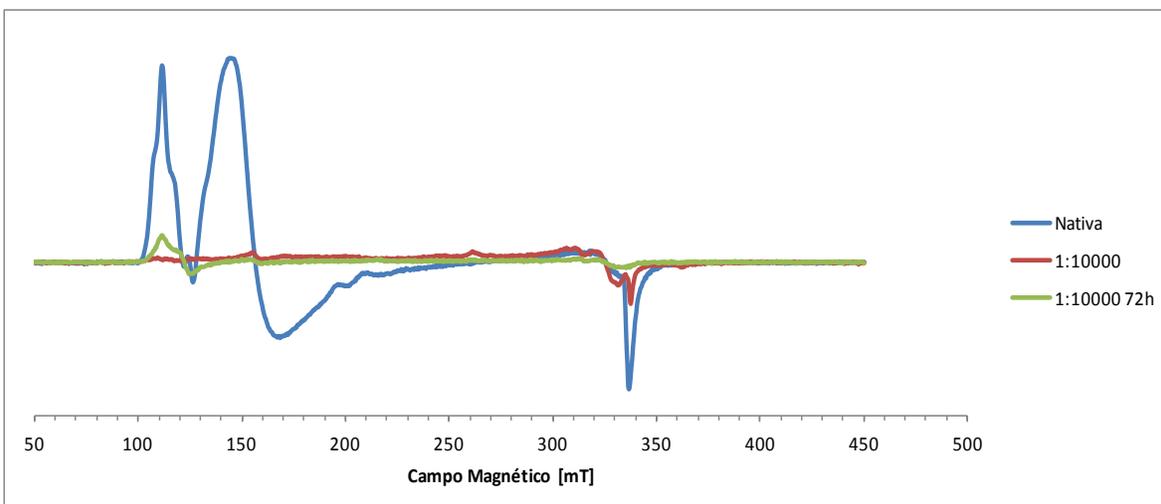


Figura 36. Espectro a 5 K de la ZoPrx nativa (línea azul) y a 4 K de la relación 1:10,000 ZoPrx:H₂O₂ (línea roja) y 1:10,000 después de 72 horas (línea verde) a 18 K. El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.4 mT; potencia, 2 mW, frecuencia de modulación, 100 kHz.

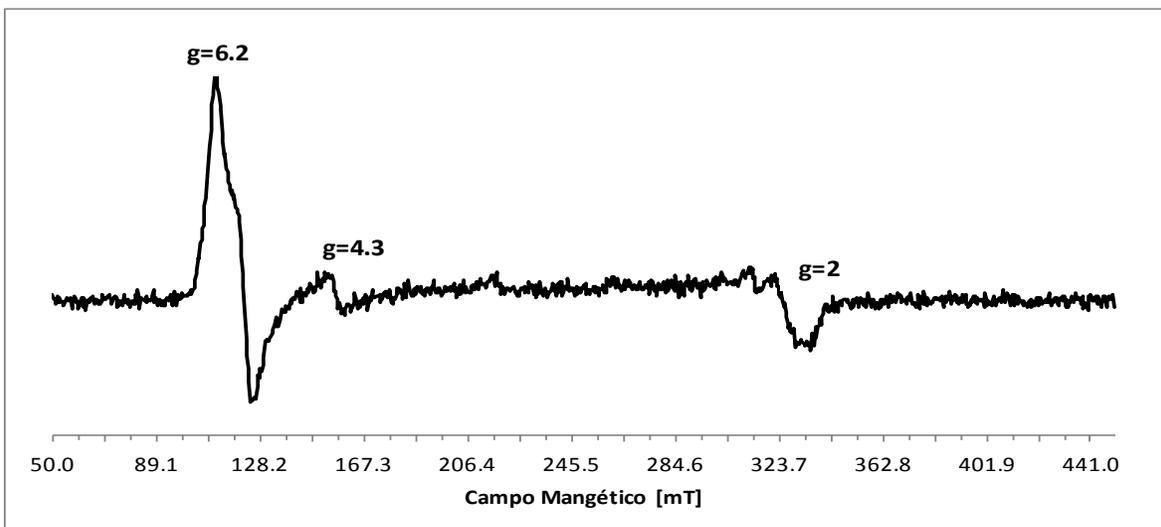


Figura 37. Espectro 1:10,000 después de 72 horas a 18 K. El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.4 mT; potencia, 2 mW; frecuencia de modulación, 100 kHz.

De las reacciones incubadas por 72 horas a 4 °C se obtuvieron espectros de tres reacciones en las siguientes relaciones molares, 1:100, 1:1000 y 1:10,000, como ya se mencionó, las temperaturas que fueron obtenidas no son óptimas para la detección del espectro, (17, 21 y 18 K). Sin embargo, las señales generadas fueron las mismas para cada uno de los espectros, consistente con el restablecimiento de las señales del estado basal (Figura 38).

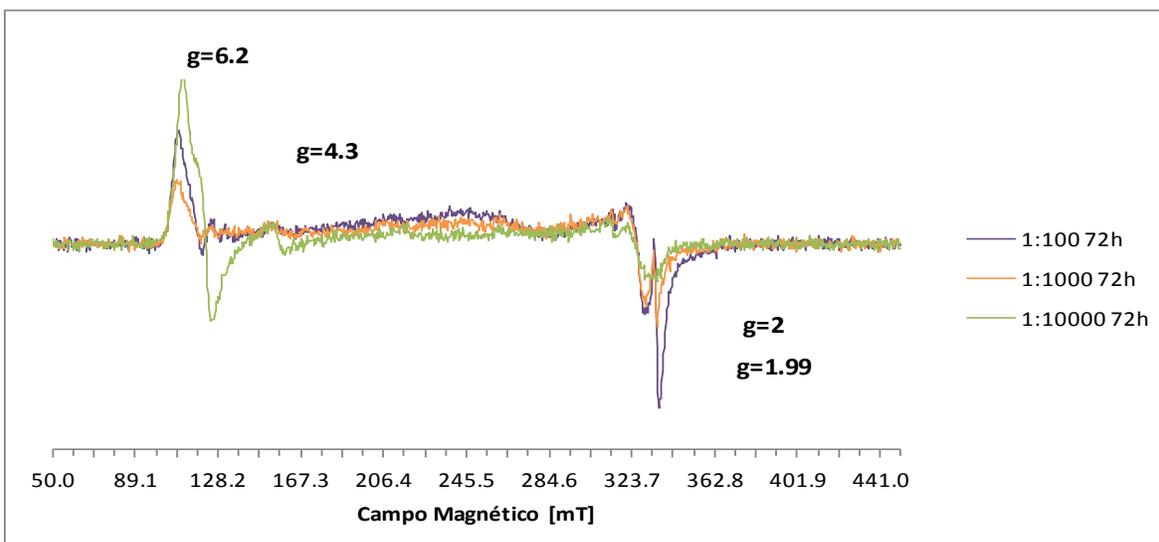


Figura 38. Espectro a 17 K de la ZoPrx en presencia de peróxido de hidrógeno 1:100 (morado) registrado luego de 72 h., espectro a 21 K de la relación 1:1,000 (naranja) después de 72 h y espectro 1:10,000 (verde) después de 72 horas a 18 K. El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.4 mT; potencia, 2 mW; frecuencia de modulación, 100 kHz.

CONCLUSIONES

Si bien existe gran similitud entre la ZoPrx y otras hemoperoxidasas, la alta resistencia a la inactivación ante altas concentraciones de peróxido de hidrógeno la distingue. Esta característica y la identificación del intermediario generado a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno permiten sugerir que las características estructurales del sitio activo también son distintas en la ZoPrx y que probablemente, su ciclo catalítico presente una vía alterna que lleva a la formación del intermediario con un grupo hidroxilo hexacoordinado, mismo que eventualmente, decae al estado basal y/o a la inactivación parcial de la proteína y que la estabilidad de la hemoproteína al peróxido de hidrógeno, podría deberse a las propiedades electrónicas únicas de su sitio activo.

En este trabajo se demostró que la ZoPrx presenta un comportamiento por EPR característico de las peroxidases clase III; igualmente se logró la obtención de un buen espectro de EPR para el compuesto I, típico intermediario del ciclo catalítico de las peroxidases de plantas y activo para esta espectroscopía. Si bien no se obtuvo la formación del compuesto III descrito como el intermediario típico formado por las hemoperoxidasas en presencia de exceso de peróxido de hidrógeno, se tiene la formación de un intermediario con señales en EPR características de hemoproteínas no-enzimáticas en la cuales el hierro se encuentra hexacoordinado por un grupo hidroxilo^{57,59}; sugiriendo así la formación de un compuesto de características similares en el caso de la ZoPrx, aunque estructuralmente no se tiene evidencia de algún grupo hidroxilo proporcionado por alguno de los residuos de aminoácidos en la cavidad del hemo. Por lo anterior, se puede concluir que efectivamente las propiedades electrónicas del sitio activo de la Zo peroxidasa son únicas y que pudieran ser la causa de sus propiedades catalíticas y su alta estabilidad.

PERSPECTIVAS

La obtención de este nuevo intermediario, característico de la ZoPrx da la pauta para la exploración del mismo. Su estudio y caracterización por otras técnicas espectroscópicas como dicroísmo circular (CD), espectroscopía mössbauer e incluso rayos X son de gran

importancia ya que aportaran información valiosa de las características estructurales del sitio activo y una mayor comprensión del modo en que se lleva la catálisis.

Adicionalmente, la exploración de nuevos experimentos por espectroscopía paramagnética electrónica (EPR) en diferentes condiciones de reacción también aportarán información respecto a las características electrónicas del compuesto diferente que presenta la ZoPrx anteriormente descrito, información que permitirá describir la estructura, estabilidad y formación de los intermediarios y el producto de decaimiento en la Zo Peroxidasas, conocimiento fundamental necesario para entender y controlar su estabilidad al H_2O_2 .

ANEXO

Experimentos de reacciones con sustrato reductor

El objetivo de esta serie de experimentos fue la observación de los radicales generados por la de oxidación del sustrato (guayacol o *p*-cresol) bajo las diferentes condiciones de estudio a 70 K como muestra la tabla 4:

Tabla 3. Resumen de preparaciones para caracterización por EPR en presencia de sustrato reductor.

Exp.	T (K)	[ZoPrx] (M)	[H ₂ O ₂] (M)	ZoPrz:H ₂ O ₂	ZoPrx:Sustrato reductor	Guayacol (M)	<i>p</i> -cresol (M)
7	70	8.4x10 ⁻⁵	5.7x10 ⁻³	1:8	1:300	0.04	-
8	70	8.4x10 ⁻⁵	5.7x10 ⁻³	1:8	1:300	-	0.04
9	70	8.4x10 ⁻⁵	7.2	1:10,000	1:300	-	0.04

Se utilizó una relación proteína:peróxido:guayacol de 1:8:300, bajo las cuales se demostró anteriormente que se formó el compuesto I adquiriendo el registro a 70 K. En la Figura 39 se muestra la señal en $g=2.0065$ indicativa de la presencia del radical de guayacol formado en la reacción aunque no se observa la estructura superhiperfina en la señal. A pesar de que se intentó adquirir el espectro a diferentes modulaciones del campo magnético no fue posible obtener la estructura hiperfina.

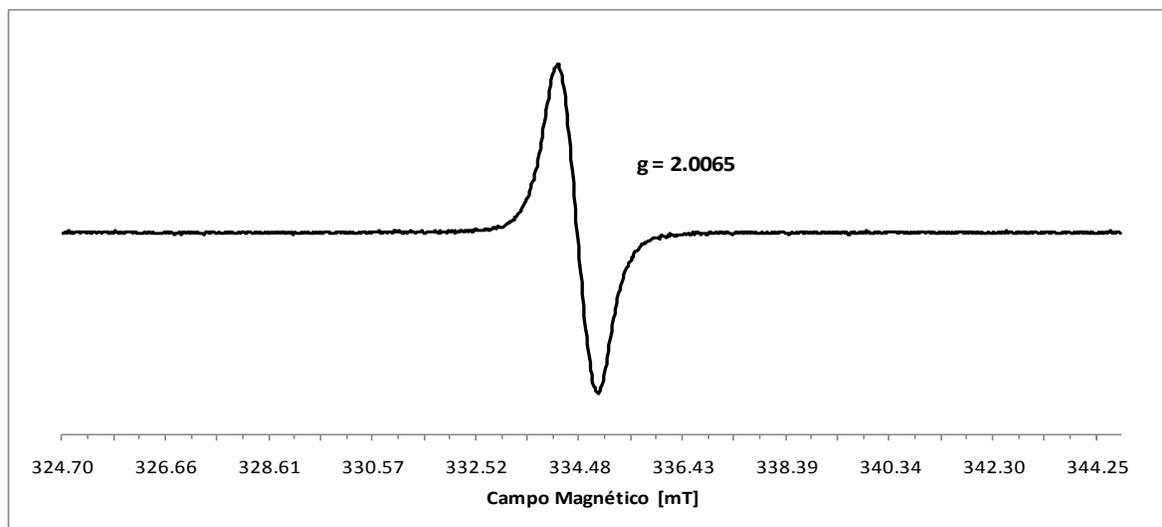


Figura 39. Espectro a 70 K de la ZoPrx en presencia de peróxido de hidrógeno en relación 1:8, y ZoPrx:guayacol 1:300. El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.1 mT; potencia, 0.64 mW; frecuencia de modulación, 100 kHz.

En el experimento siguiente se utilizó la misma relación del anterior (1:8:300), aunque esta vez se el sustrato reductor *p*-cresol a 70 K. Como se muestra en la figura 40, fue posible detectar el radical del *p*-cresol formado en la reacción con la señal en $g=2.0033$ y en este caso se observó la estructura superhiperfina en la señal.

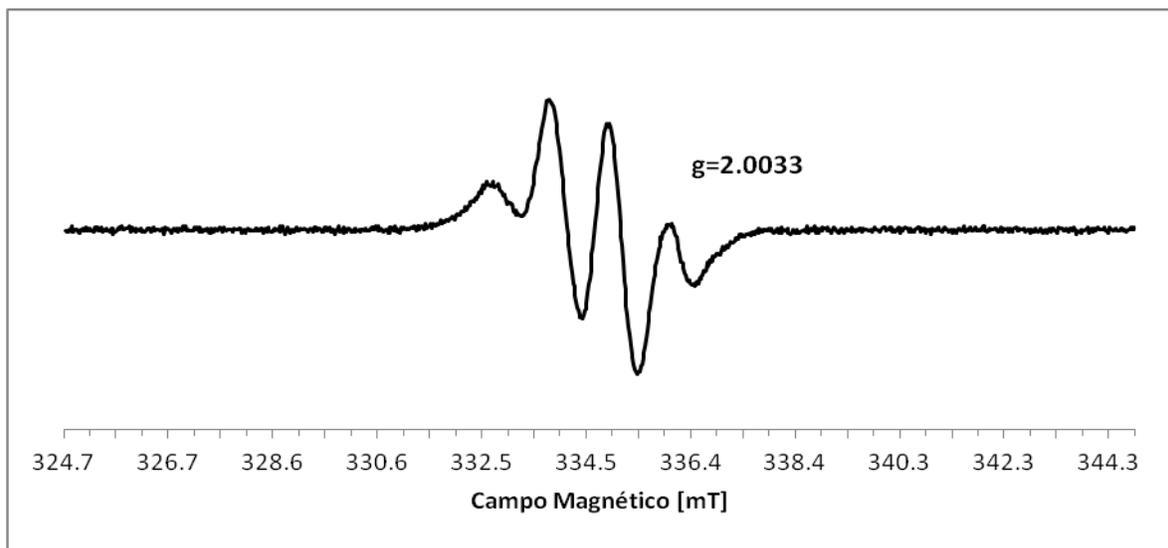


Figura 40. Espectro a 70 K de la ZoPrx en presencia de peróxido de hidrógeno en relación 1:8, y ZoPrx:*p*-cresol 1:300. El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.1 mT; potencia, 0.64 mW; frecuencia de modulación, 100 kHz.

A continuación, se utilizó una relación proteína:peróxido:*p*-cresol de 1:10,000:300, condiciones bajo las cuales se formó el nuevo compuesto en presencia de exceso de peróxido de hidrógeno. El espectro fue adquiriendo a 70 K y bajo estas condiciones, la reacción se realizó mezclando la proteína con *p*-cresol, a continuación, se agregó el peróxido de hidrógeno e inmediatamente se realizó la medición. Como resultados se obtuvo la formación del radical de sustrato (Figura 41). Esta observación muestra la alta resistencia de la enzima a la desactivación aún cuando se tiene la presencia de peróxido en exceso.

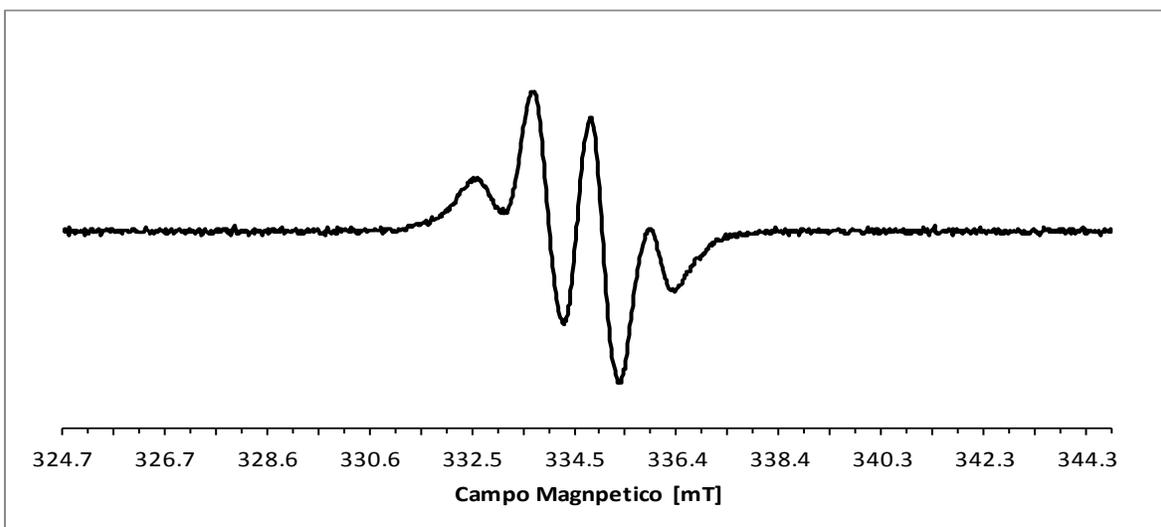


Figura 41. Espectro a 70 K de la ZoPrx en presencia de peróxido de hidrógeno en relación 1:10,000, y ZoPrx:*p*-cresol 1:300. El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.1 mT; potencia, 0.64 mW; frecuencia de modulación 100 kHz.

Interesantemente, el radical generado presentó exactamente la misma intensidad que la reacción previamente realizada en relación 1:8 enzima:H₂O₂ (Figura 42), evidenciando una vez más que la enzima es aún activa en presencia de un exceso de peróxido de 10,000 equivalentes.

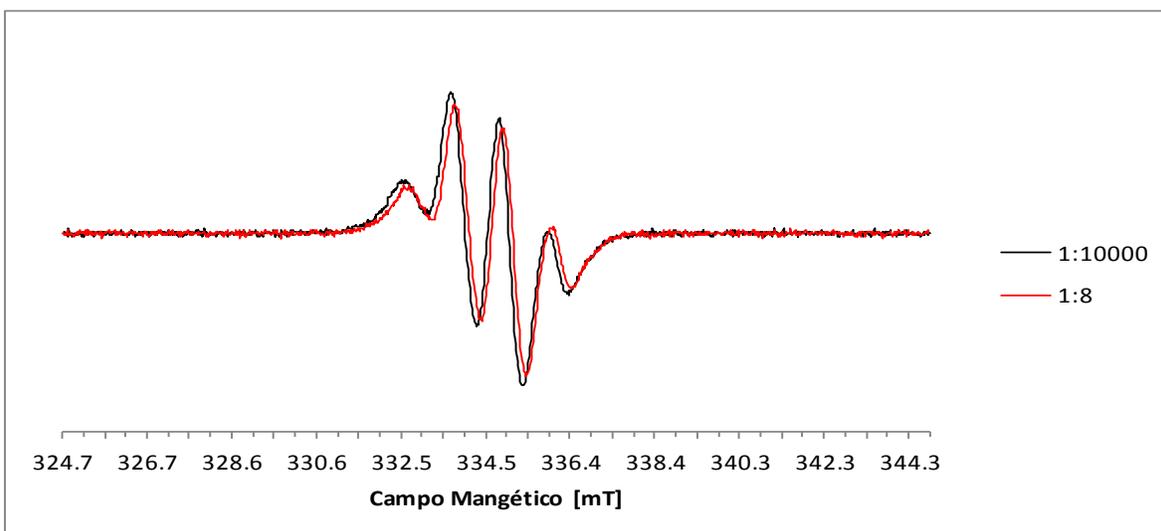


Figura 42. Espectro a 70 K de la ZoPrx en relación ZoPrx:peróxido:*p*-cresol 1:8:300 y 1:10,000:300. El espectro fue adquirido en las siguientes condiciones: 9.39 GHz; amplitud de modulación, 0.1 mT; potencia, 0.64 mW; frecuencia de modulación, 100 kHz.

REFERENCIAS

- ¹ Crichton, R. R. (2008). *Biological Inorganic Chemistry*. Cap. 3. Elsevier.
- ² Dunford, H. B. (1999). *Hemo peroxidases*. Cap. 1 y 2. Wiley-VCH.
- ³ Crabtree, R. H. (2001). *The Organometallic Chemistry of the Transition Metals*. John Wiley & Sons. Capítulo 1.
- ⁴ Peisach, J., Blumberg, W. E., Wittenberg, B. A. & Wittenberg, J. B. (1968). Electronic structure of protoheme proteins. III. Configuration of the heme and its ligands. *J. Biol. Chem.* **243**, 1871–1880.
- ⁵ Andreini, C., Vertini, I. & Rosato, A. (2009). Metalloproteomes : A Bioinformatic Approach. *Accounts of chemical research.* **42**, 1471-1479.
- ⁶ Nigel, C. & Smith, A. T. (2000). Horseradish peroxidase. *Advances in Inorganic Chemistry*. 14, 107-152.
- ⁷ Holm, R. H., Kennepohl, P. & Solomon, E. I. (1996). Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chem. Rev.* **96**, 2239-2314.
- ⁸ Cowan, J.A. (1997). *Inorganic Biochemistry: An Introduction*. Cap. 2. Wiley-VCH.
- ⁹ Graeme, H. & Lawrence B. (2009). *High Resolution EPR Applications to Metalloenzymes and Metals in Medicine*. Cap. 8. Springer.
- ¹⁰ Guang Z. (2012). *NMR of Proteins and Small Biomolecules*. Cap. 4. Springer.
- ¹¹ Thomas G. S. & Roman, S. C. (1995). Resonance Raman Spectroscopy of Metalloproteins. *Methods in Enzymology*, **246**, 416-460.
- ¹² Kendrick, M. J., May, T. M., Plishka, M. J. & Robinson, K. D. (1992). *Metals in Biological Systems*. Cap. 9. Ellison Horwood.
- ¹³ Frausto da Silva, J. J. R. & Williams, R. J. P. (1991). *The Biological Chemistry of the Elements. The Inorganic Chemistry of Life*. Cap. 13. Oxford University Press.
- ¹⁴ Hughes, M. N. (1981). *The Inorganic Chemistry of Biological Processes*. Cap. 1. John Wiley & Sons.
- ¹⁵ Kaim, W. & Schwederski, B. & Klein, A. (1991). *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry Life. An Introduction and Guide*. Cap. 6. Board.
- ¹⁶ Taylor, T. G. (1981). Synthetic Model Compounds for Hemoproteins. *Acc. Chem. Res.* **14**, 102-109.
- ¹⁷ Gadsby, P. M. A., Peterson, J., Foote, N., Greengood, C. & Thompson, A. (1987). Identification of the ligand-exchange process in the alkaline transition of horse heart cytochrome c. *Biochem. J.* **246**, 43-54.
- ¹⁸ Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M. J., Liers, C., & Lundell, T. (2010). New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 871-897.
- ¹⁹ Welinder, K. G. (1992). Superfamily of plants, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 388-393.
- ²⁰ Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y. & Matsui, H. (2001). A Large Family of Class III Plant Peroxidases. *Plant Cell Physiol.* **42**, 462-468.
- ²¹ Howes, D. B., Feis, A., Raimondi, L., Indiana, C. & Smulevich, G. (2001). The Critical Role of the Peroximal Calcium Ion in the Structural Properties of Horseradish Peroxidase. *J. Biol. Chem.* **276**, 40704-40711.
- ²² Hiner, A. N. P., Sidrach, L., Chazarra, S., Varón, R., Tudela, J., García-Cánovas, F. & Rodríguez-López, J. N. (2003). Compound I Formation in Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Peroxidase Is Modulated by the Equilibrium between Pentacoordinated and 6-Aquo Hexacoordinated Forms. *Biochemistry* **42**, 8799-8808.

-
- ²³ Makino, R., Chiang, R. & Hager, L.P. (1976). Oxido-reduction potential measurements on chloroperoxidase heme complexes. *Biochemistry* **15**, 4748–4754.
- ²⁴ Millis, C.D., Cai, D., Stankovic, M.T. and Tien, M. (1989). Oxidation-reduction potentials and ionization states of extracellular peroxidases from the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* **28**, 8484–8489.
- ²⁵ Banci, L. (1997). Structural properties of peroxidases. *Journal of Biotechnology* **53**, 253–263.
- ²⁶ Veitch, N. C. (2004). Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochemistry Reviews* **3**, 3–18.
- ²⁷ Torres, E. & Ayala, M. (2010). *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. Cap. 4 y 11. Springer.
- ²⁸ Gajhede, M., Schuller, D. J., Henriksen, A., Smith, A. T. & Poulos, T. L. (1997). Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nature Structural Biology* **4**, 1032–1038.
- ²⁹ Henriksen, A., Smith, A. T. & Gajhede, M. (1999). The Structures of the Horseradish Peroxidase C-Ferulic Acid Complex and the Ternary Complex with Cyanide Suggest How Peroxidases Oxidize Small Phenolic Substrates. *J. Biol. Chem.* **274**, 35005–35011.
- ³⁰ Verdín, J., Pogni, R., Beza, A., Baratto, M. C., Basosi, R. & Vázquez-Duhalt, R. (2006). Mechanism of versatile peroxidase inactivation by Ca²⁺ depletion. *Biophysical Chemistry*. **121**, 163–170.
- ³¹ Wormald, M. R. & Dwek, R. A. (1999). Glycoproteins: Glycan presentation and protein-fold stability. *Structure* **7** (7), 155–160.
- ³² Passardi, F., Cosio, C., Penel, C. & Dunand, C. (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* **24**, 255–265.
- ³³ Ostergaard, L., Abelskov, A. K., Mattsson, O. & Welinder, K. G. (1996). Structure and organ specificity of an anionic peroxidase from *Arabidopsis thaliana* cell suspension culture. *FEBS Letters* **398**, 243–247.
- ³⁴ Jiménez Arroyo N. (2012). Estructura Cristalográfica de la Zo-Peroxidasa de *Raphanus sativus* L. Daikon. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM-IBT.
- ³⁵ Weinryb, I. (1966) The behavior of Horseradish peroxidase at high hydrogen peroxide concentrations. *Biochemistry* **5**, 2003–2008.
- ³⁶ Hersleth, H. P., Ryde, U., Rydberg, P., Gorbitz, C. H., & Andersson, K. K. (2006). Structure of the high-valent metal-ion haem-oxygen intermediates in peroxidases, oxygenases and catalases. *J. Inorg. Biochem.* **100**, 460–476.
- ³⁷ Everse, J. (1998). The Structure of Heme Proteins Compounds I and II: Some Misconceptions. *Free Radical Biology & Medicine* **24**, 1338–1346.
- ³⁸ Goodin, D. B., Mauk, A. G. & Smith, M. (1987) The Peroxide Complex of Yeast Cytochrome c Peroxidase Contains Two Distinct Radical Species, Neither of Which Resides at Methionine 172 or Tryptophan 51*. *J. Biol. Chem.* **262**, 7719–7724.
- ³⁹ Hiner, A. N. P., Martínez, J. I., Arnao, M. B., Acosta, M., Turner, D. D., Raven, E. L. & Rodríguez-López, J. N. (2001) Detection of a tryptophan radical in the reaction of ascorbate peroxidase with hydrogen peroxide *Eur. J. Biochem.* **268**, 3091–3098.
- ⁴⁰ Poulos, T. L., & Kraut, J. (1980). The stereochemistry of peroxidase catalysis. *J. Biol. Chem.* **255**, 8199–8205.
- ⁴¹ Smith, A. T., N. & Veitch, N. C. (1998). Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. *Current Opinion in Chemical Biology* **2**, 269–278.
- ⁴² Hayashi, Y & Yamazaki, I. (1979) The oxidation-reduction potentials of compound I/compound II and compound II/ferric couples of horseradish peroxidases A2 and C. *J. Biol. Chem.* **254**, 9101–9106.
- ⁴³ Valderrama, B. Ayala, M. & Vazquez-Duhalt, R. (2002). Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chemistry & Biology* **9**, 555–565.

-
- ⁴⁴ Hiner, A., Hernández-Ruíz, J., Rodríguez-López, J. N., Arnao, M. B., Varón, R. & García-Cánovas, F. (2001). The inactivation of horseradish peroxidase isoenzyme A2 by hydrogen peroxide: an example of partial resistance due to the formation of a stable enzyme intermediate. *J. Biol. Inorg. Chem.* **6**, 504-516.
- ⁴⁵ Keilin, D. & Mann, T. (1937). On the Haematin Compound of Peroxidase. *Biological Science* **122**, 119-133.
- ⁴⁶ Blumberg, W. E., Peisach, J., Wittemberg, B. A. et al. (1968). The electronic structure of protohemo proteins. I. An electron paramagnetic resonance and optical study of horseradish peroxidase and its derivatives. *J. Biol. Chem.* **243**, 1854-1862.
- ⁴⁷ Wittemberg, B. A., Wittemberg, J. B., Peisach, J. et al. (1970). On the state of the iron and the nature of the ligand on in oxyhemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **67**, 1846-1862.
- ⁴⁸ Gil-Rodríguez, P., Ferreira-Batista, C. Vázquez-Duhalt, R. & Valderrama, B. (2008). A Novel Heme Peroxidase from *Raphanus sativus* Intrinsically Resistant to Hydrogen Peroxide. *Eng. Life. Sci.* **3**, 286-296.
- ⁴⁹ Gil Rodríguez P. (2006). Zo Peroxidasa: Mecanismo de Reacción de una Peroxidasa Intrínsecamente estable al peróxido de hidrógeno. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas UNAM-IBT.
- ⁵⁰ Rodríguez-López, J.N., Smith, A.T., & Thorneley, R.N.F. (1996). Role of Arginine 38 in horseradish peroxidase. A critical residue for substrate binding and catalysis. *J. Biol. Chem.* **271**, 4023-4030.
- ⁵¹ Ayala, I., Kim, S. & Barry, B.A. (1999). A Difference Fourier transform infrared study of tyrosyl radical Z* decay in photosystem II. *Biophys. J.* **77**, 2137-2144.
- ⁵² Davies, M. J. & Dean, R. T. (1997). *Formation and chemistry of radicals involved in amino acid, peptide, and protein oxidation. In Radical-mediated protein oxidation. From chemistry to medicine.* Cap. 2. Oxford.
- ⁵³ Fielding, A. J., Brodhun, F., Koch, C., Pievo, R., Denysenkov, V., Feussner, I. & Bennati, M. (2011). Multifrequency Electron Paramagnetic Resonance Characterization of PpoA, a CYP450 Fusion Protein that Catalyzes Fatty Acid Dioxygenation. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 9052-9062.
- ⁵⁴ Indiani, C., Feis, A., Howes, B. D., Marzocchi, M. P. & Smulevich, G. (2000). Benzohydroxamic Acid-Peroxidase Complexes: Spectroscopic Characterization of a Novel Heme Spin Species. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 7368-7376.
- ⁵⁵ Howes, D. B., Schiødt, C. B., Welinder, K. G., Marzocchi, M. P., Ma, J., Zhang, J., Shelnutt, J. A. & Smulevich, G. (1999). The Quantum Mixed-Spin Heme State of Barley Peroxidase: A Paradigm for Class III Peroxidases, *Biophysical Journal* **77**, 478-492.
- ⁵⁶ Patterson, W. R., Poulos, T. L. J. & Goodins, B. D. (1995). Identification of a Porphyrin π Cation Radical in Ascorbate Peroxidase Compound I. *Biochemistry* **34**, 4342-4345.
- ⁵⁷ Jones, D. K., Dalton, D. A., Rosell, F. I. & Raven, E. L. (1998). Class I Heme Peroxidases: Characterization of Soybean Ascorbate Peroxidase *Archives of Biochemistry and Biophysics* **360**, 173-178.
- ⁵⁸ Jensen, K. P. & Ryde, U. (2004). How O₂ Binds to Heme: Reasons for Rapid Binding and Spin Inversion. *J. Biol. Chem.* **279**, 14561-14569.
- ⁵⁹ Di Iorio, E. E., Winterhalter, K. H., Mansouri, A., Blumberg, W. E. & Peisach, J. (1984). Studies on the oxidation of hemoglobin Zurich (beta₆₃ E7 Arg. *Eur. J. Biochem.* **145**, 549-554.