



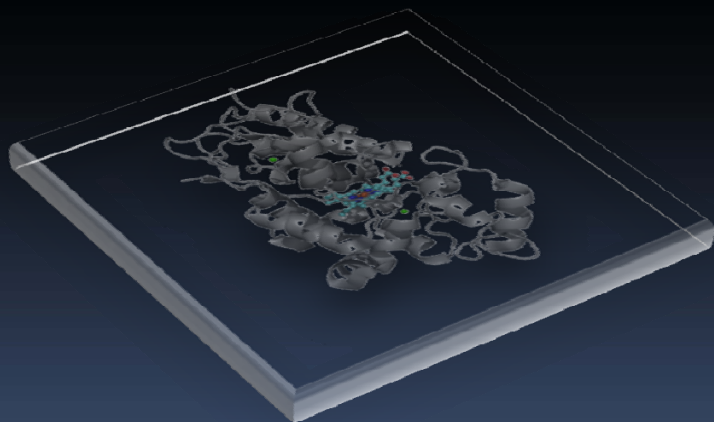
VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

FACULTAD DE CIENCIAS QVÍMICAS.

DEPARTAMENTO QVÍMICA FÍSICA

**TESIS DOCTORAL**

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICO-FÍSICA  
DE LA PEROXIDASA DE  
PALMA *Chamaerops excelsa***



**NAZARET HIDALGO CUADRADO**

**2011**



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA**

**TESIS DOCTORAL**

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICO-FÍSICA  
DE LA PALMA *Chamaerops excelsa***

**NAZARET HIDALGO CUADRADO**

**2011**





**UNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA**

Plaza de los Caídos s/n  
37008 – Salamanca  
Tel. (34)923294500 (ext. 4487)  
Fax. (34)923294574  
<http://fisquim.usal.es/>

**DR. D. MANUEL GARCÍA ROIG**, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y **DR. D. VALERY L. SHNYROV**, PROFESOR CONTRATADO DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

**CERTIFICAN:**

Que la presente Tesis Doctoral que lleva por título: **“Caracterización Químico-Física de la peroxidasa de palma *Chamaerops excelsa*”**, que para optar al grado de Doctora en Química por la Universidad de Salamanca presenta **Dña. NAZARET HIDALGO CUADRADO**, ha sido realizada bajo nuestra dirección.

En los términos establecidos por la normativa reguladora de los estudios de Tercer ciclo y Doctorado de la Universidad de Salamanca, se autoriza la presentación de este trabajo como investigación de Tesis Doctoral para que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firman el presente certificado en Salamanca, a 26 de Septiembre de 2011.

Dr. Manuel García Roig

Dr. Valery L. Shnyrov



## **Agradecimientos**

*Como dejó escrito un anónimo “el agradecimiento es la memoria del corazón”. No obstante, en estas líneas me gustaría expresar mi reconocimiento a todas las personas que han contribuido a la realización de esta tesis, y a que este trabajo haya a la vez enmarcado una etapa en mi vida extraordinaria.*

*En primer lugar, debo agradecer a mi director el Dr. Valery L. Shnyrov por haberme elegido para trabajar con él. Le agradezco enormemente su labor como director de esta tesis, sus enseñanzas científicas y consejos personales, lo mucho que he disfrutado de su sabiduría y sentido del humor y sobre todo su confianza en todas mis ideas, para permitirme llevarlas a cabo.*

*Mi reconocimiento y gratitud a mi otro gran director, el Dr. Manuel G. Roig, por la ayuda prestada estos años en la realización de este trabajo.*

*Al Dr. Igor Polikarpov y su instituto de Física de Sao Carlos, Universidad de Sao Paulo, Brazil, por su ayuda en los experimentos de cristalización y difracción por rayos-X.*

*A mis compañeros del 108 y 106, del departamento de Bioquímica y Biología Molecular, por los buenos momentos que hemos pasado juntos, tanto dentro como fuera del laboratorio. A todos ellos gracias por haberme hecho la vida más alegre en estos años.*

*A mis amigos, por preocuparse cada día de cómo van las cosas, sin saber qué es exactamente lo que hago, y por su compañía.*

*A la futura doctora Esmeralda Vega, que fue sin quererlo, quien me introdujo en este mundo. Muchas gracias Esme por ayudarme a decidir cuál era el futuro que quería para mí.*

*Y en último lugar, pero quienes realmente deberían de ser los primeros en esta lista, mi agradecimiento a mi familia. A mi hermano, que es el que me ha levantado cada día en la redacción de esta tesis con la frase “Aquí ya huele a ciencia” y por hacerme reír cada día, gracias Alvarito. A mis abuelos maternos, que les habría encantado ver todo esto, porque para ellos lo más importante era seguir creciendo. Y en especial... a mis Padres, incondicionales, que se llevaron la peor parte de esta Tesis. Gracias, por ser siempre un gran ejemplo de superación, por la educación que me habéis ofrecido y por siempre estar a mi lado mostrándome vuestro apoyo. Por ello, solo por ello, esta tesis os la dedico a vosotros.*



## NOTA PRELIMINAR

Los resultados recogidos en la presente memoria se han publicado en las siguientes revistas:

Laura S. Zamorano, Susana Barrera Vilarmau, Juan B. Arellano, Galina G. Zhadan, Nazaret Hidalgo Cuadrado, Sergey A. Bursakov, Manuel G. Roig, Valery L. Shnyrov. Thermal stability of peroxidase from *Chamaerops excelsa* palm tree at pH 3. *International Journal of Biological Macromolecules* (2009).

Nazaret Hidalgo Cuadrado, Juan B. Arellano, Juan J. Calvete, Libia Sanz, Galina G. Zhadan, Igor Polikarpov, Sergey Bursakov, Manuel G. Roig, Valery L. Shnyrov. Substrate specificity of the *Chamaerops excelsa* palm tree peroxidase. A steady-state kinetic study. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (2011a).

Nazaret Hidalgo Cuadrado, Galina G. Zhadan, Manuel G. Roig, Valery L. Shnyrov. Suicide inactivation of peroxidase from *Chamaerops excelsa* palm tree leaves. *Journal of Biological Macromolecules* (2011b).

Nazaret Hidalgo Cuadrado, Juan B. Arellano, Juan J. Calvete, Libia Sanz, Galina G. Zhadan, Larissa C. Textor, Igor Polikarpov, Sergey Bursakov, Manuel G. Roig, Valery L. Shnyrov. Palm peroxidases: the most robust enzymes. *Current Topics in Biochemical Research* (2011c).

Larissa C. Textor, Jademilson C. Santos, Nazaret Hidalgo Cuadrado, Manuel G. Roig, Galina G. Zhadan, Valery L. Shnyrov, Igor Polikarpov. Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of *Chamaerops excelsa* palm tree peroxidase *Acta Crystallographica Section F (Structural Biology and Crystallization Communications)* (2011).

Así mismo se han presentado parte de estos resultados en sesión de “poster” en el siguiente congreso nacional:

“Estabilidad térmica a pH de la peroxidasa de palmera *Chamaerops excelsa*”

XXXII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular

Oviedo, España. 23-26 de Septiembre de 2009.





*El futuro tiene muchos nombres. Para los débiles es lo inalcanzable. Para los temerosos, lo desconocido. Para los valientes es la oportunidad.*

*Victor Hugo*

*A mis padres...*



## ÍNDICE

<b>Abreviaturas</b> .....	<b>i</b>
<b>PARTE I.- INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>PARTE II.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b> .....	<b>7</b>
2.1. Peroxidasas de Palma: Una breve introducción.....	9
2.2. Superfamilia de las peroxidasas de palma.....	10
2.3. Componentes estructurales de las peroxidasas de palmera.....	12
2.3.1. El centro activo .....	14
2.3.2. Los glicanos.....	17
2.4. Estabilidad de las peroxidasas de palmera .....	18
2.5. Cinética del estado estacionario .....	21
2.6. Inactivación suicida de las peroxidasas.....	23
<b>PARTE III.- OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
<b>PARTE IV.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
4.1. Material .....	31
4.1.1. Purificación .....	31
4.1.2. Caracterización Físico-Química. ....	32
4.1.3. Cristalografía de proteínas. ....	33
4.2. Reactivos.....	33
4.2.1. Purificación .....	33
4.2.2. Sustrato de actividad peroxidasa.....	33
4.2.3. Técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida .....	34
4.2.4. Método de Lowry.....	34
4.2.5. Técnicas cristalográficas.....	34
4.2.6. Técnicas de isoelectroenfoque .....	34
4.3. Material Biológico.....	35
4.3.1. Palmera <i>Chamaerops excelsa</i> .....	35
4.4. Métodos experimentales.....	37

4.4.1. Purificación de la peroxidasa de palmera <i>Chamaerops excelsa</i> .....	37
4.4.1.1. Recolección y limpieza de las hojas .....	37
4.4.1.2. Homogeneización .....	37
4.4.1.3. Extracción de pigmentos por reparto bifásico .....	39
4.4.1.4. Fraccionamiento cromatográfico.....	41
4.4.1.4.1. Cromatografía hidrofóbica .....	41
4.4.1.4.2. Cromatografía de intercambio iónico.....	42
4.4.1.4.3. Cromatografía de exclusión molecular o en gel .....	43
4.4.2. Características de la CEP.....	45
4.4.2.1. Análisis de la actividad enzimática.....	45
4.4.2.2. Análisis del contenido proteico en solución.....	46
4.4.2.3. Análisis de la pureza por gel de poliacrilamida ...	47
4.4.2.4. Determinación del punto isoeléctrico .....	49
4.4.2.5. Determinación de la masa molecular/estado de agregación mediante cromatografía de exclusión molecular .....	51
4.4.3. Estabilidad de la peroxidasa de palmera .....	53
4.4.3.1. Calorimetría diferencial de barrido .....	53
4.4.3.1.1. Microcalorimetría DSC de proteínas .....	54
4.4.3.1.2. Análisis de la desnaturalización térmica reversible .....	55
- <i>Modelo de equilibrio de dos estados</i> .....	55
4.4.3.1.3. Análisis de la desnaturalización térmica irreversible .....	60
- <i>Modelo simple de los dos estados</i> .....	61
4.4.2.1.4. Experimento calorimétrico .....	63
4.4.3.2. Fluorescencia de proteínas.....	65

4.4.3.2.1. Estrategias generales de fluorescencia en el estudio de proteínas.....	66
4.4.3.2.2. Fluorescencia intrínseca de las proteínas.....	67
4.4.3.2.3. Experimento de fluorescencia.....	69
4.4.3.3. Dicroísmo circular (CD).....	71
4.4.3.3.1. Aplicaciones CD a proteínas.....	72
4.4.3.3.2. Experimento CD.....	73
4.4.4. Estudios cinéticos y mecanismos catalíticos.....	75
4.4.4.1. Cinética del estado estacionario.....	75
4.4.4.1.1. Determinación de las constantes microscópicas.....	77
4.4.4.1.2. Determinación de las constantes macroscópicas.....	78
4.4.4.2. Inhibición competitiva por sustrato.....	80
4.4.4.3. Inactivación por sustrato suicida.....	82
4.4.4.3.1. Determinación del número de recambio (r) para la inactivación por peróxido de hidrógeno.....	83
4.4.4.3.2. Cinética de inactivación por peróxido de hidrógeno.....	83
4.4.4.3.3. Modelo de inactivación.....	84
4.4.5. Cristalización y determinación de la estructura proteica por difracción de rayos X.....	86
4.4.5.1. Cristalización de <i>Chamaerops excelsa</i> .....	88
4.4.5.2. Recogida de datos y procesado.....	88
<b>PARTE V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>90</b>
5.1. Proceso de purificación de la peroxidasa de palmera <i>Chamaerops excelsa</i> .....	90
5.1.1. Cromatografía hidrofóbica.....	93
5.1.2. Cromatografía de intercambio iónico.....	94
5.1.3. Cromatografía de exclusión molecular.....	96

5.1.4. Rendimiento de la purificación .....	96
5.2. Características de las peroxidasa de palmera <i>Chamaerops excelsa</i> .....	98
5.2.1. Determinación de la masa molecular por PAGE.....	98
5.2.2. Determinación del punto isoeléctrico .....	99
5.2.3. Determinación del estado de agregación mediante cromatografía de exclusión molecular .....	100
5.3. Estabilidad de las peroxidasa de palmera <i>Chamaerops excelsa</i> .....	101
5.3.1. Desnaturalización inducida por el pH .....	101
5.3.2. Desnaturalización térmica mediante calorimetría diferencial de barrido.....	103
5.3.3. Experimento de dicroísmo circular .....	108
5.3.4. Experimento de fluorescencia .....	110
5.4. Mecanismo catalítico y estudios cinéticos.....	111
5.4.1. Ecuación de velocidad del estado estacionario y parámetros cinéticos de las reacciones de oxidación catalizadas por CEP.....	111
5.4.2. Constantes de velocidad microscópicas .....	114
5.4.3. Inhibición por sustrato .....	117
5.4.4. Inactivación por sustrato suicida .....	120
5.4.4.1. Determinación del coeficiente de partición para la inactivación de CEP por peróxido de hidrógeno.....	120
5.4.4.2. Cinética de inactivación por el peróxido de hidrógeno..	122
5.5. Cristalización y estudios preliminares cristalográficos de CEP.....	126
5.6. Sitios de interacción del sustrato en la reducción de CoI y CoII.....	128
<b>PARTE VI.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>133</b>
<b>PARTE VII.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>139</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>159</b>

**ABREVIATURAS**

A	Absorbancia
A <sub>R</sub>	Actividad residual
A <sub>0</sub>	Actividad inicial
A <sub>t</sub>	Actividad final
ABTS	2,2'-azinobis.(3etilbenzotiazolin 6 ácido sulfúrico)
ACN	Acetonitrilo
AEDT	Ácido etildiaminotetracético
APS	Persulfato amónico
AH•	Radical libre de cualquier sustrato reductor del ciclo catalítico
AH <sub>2</sub>	Cualquier sustrato reductor del ciclo catalítico
AOPTP	Peroxidasa de palma africana ( <i>Elaeis guineensis</i> )
aPrx	Isoenzima aniónica de la peroxidasa de cacahuete
APXs	Ascorbato peroxidasas
A	Fracción de proteína en estado desnaturalizado
BCA	Bicarbonato amónico
BCPX	Peroxidasas catalasas de bacterias
BP	Peroxidasa de cebada
BP1	Isoenzima 1 de la peroxidasa catalasa de cebada.
BSA	Albúmina de suero bovino
CcP	Citocromo c peroxidasa
CEP	Peroxidasa de palmera <i>Chamaerops excelsa</i> .
HRP-C	Isoenzima c de la peroxidasa de rábano picante.
CID	Disociación inducida por colisión
CiP	<i>Coprinus cinereus</i> peroxidasa
CoI	Compuesto I, primera forma enzimática intermedia de las peroxidasas
CoII	Compuesto II, segunda forma enzimática intermedia de la peroxidasa
CoIII	Compuesto III, forma enzimática intermedia que surge cuando la enzima se encuentra en franco exceso de peróxido de hidrógeno
Co0	Compuesto 0, forma enzimática que aparece en



	ocasiones antes que Col
CPO	Cloroperoxidasa
cPrx	Isoenzima catiónica de la peroxidasa de cacahuete
$C_p^d(T)$	Capacidad calorífica de la biomacromolécula en estado desnaturalizado
$C_p^n(T)$ o $C_{p,N}(T)$	Capacidad de la biomacromolécula en estado nativo
$\Delta C_p$	Diferencia de capacidad calorífica entre los estado nativo y desnaturalizado de la macromolécula
$\Delta C_p^m$	Diferencia de la capacidad calorimétrica a $T_m$
$\langle C_p \rangle$	Exceso de la capacidad calorimétrica
$C_p$	Capacidad calorimétrica de referencia
D	Proteína es estado desnaturalizado
CD	Dicroísmo circular
DEAE	Dietilaminoetil
DEPC	Dietilpirocarboato
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
$\epsilon$	Coefficiente de extinción molar
[E]	Concentración de la enzima en el medio de la reacción
$E_A$	Energía de activación
$E_a$	Forma enzimática que retiene la enzima parte de su actividad
$E_i$	Forma inactiva de la enzima
ExPASy	<i>Expert Protein Analysis System</i>
FLPC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
$F_d$	Fracción de proteína en estado desnaturalizado
$F_M$	Fase móvil en FLPC
$F_S$	Fase estacionaria en FLPC
FUC	Fucosa
$\Delta G^\circ$	Energía libre de Gibbs en el equilibrio
$\Delta G^\circ (H_2O)$	Energía libre de Gibbs en ausencia de desnaturalizante
GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
HEPES	N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[ácido

	etanosulfónico]
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
$\Delta H$	Entalpía calorimétrica, área comprendida entre la transición y la línea base
$\Delta H^{vH}$	Entalpía de van't Hoff
I	Fuerza iónica
$I_F$	Intensidad de fluorescencia a una longitud de onda concreta
$I_{max}$	Intensidad máxima de fluorescencia
IEF	Isoelectroenfoque
$k_1$	Constante cinética de formación de CoI
$k_2$	Constante cinética de formación de CoII
$k_3$	Constante cinética de reducción de CoII
$k_{cat}$	Número de recambio
$K_I$	Constante de inhibición
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
LB <sub>química</sub>	Línea base química
Man	Manosa
MIR	Reemplazo isomorfo múltiple
MnP	Manganeso peroxidasa
N	Proteína en estado nativo
n	Número de subunidades que contiene una proteína
PANI	Polianilina
PEG	Polietilenglicol
PNP	Peroxidasa de cacahuete
r	Número de recambio
R	Constante de los gases ideales $8,31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$
$R_f$	Movilidad relativa
RPTP	Peroxidasa de palma real ( <i>Roystonea regia</i> )
$R_z$	Factor Reinheitszahl ( $A_{403}/A_{280}$ )
SBP	Peroxidasa de soja
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
Tampón universal	Tampón de Robinson:

	CH <sub>3</sub> COOH/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> /NaOH
TcPx	Peroxidasa de tabaco
TEMED	N, N, N', N' -tetrametiletilendiamonio
TFA	Ácido trifluoroacético
$T_m$	Temperatura a la que aparece el máximo de capacidad calorífica
$T^*$	Temperatura a la que la constante cinética de primer orden (k) toma el valor de 1 min <sup>-1</sup>
$T_{1/2}$	Temperatura a la que existe la misma cantidad de proteína en los estados nativo y desnaturalizado
$T_0$	Temperatura de referencia
TRIS	Tris-hidroximetil-aminometano
U	Proteína en estado desplegado
u.r.	Unidades relativas
XYL	Xilosa

## PARTE I

### INTRODUCCIÓN

*"(...) ¿qué es lo que sé? Mi respuesta a esta pregunta está clara: muy poco. No digo esto por modestia excesiva, sino por una convicción profunda: nos encontramos al final de esa era de la historia de la ciencia que se abrió con Galileo y Copérnico. Un periodo glorioso en verdad, pero que nos ha dejado una visión del mundo demasiado simplista. (...)"*

*Ilya Prigogine. ¿Qué es lo que no sabemos?. 1995. Forum Filosófico de la  
UNESCO.*



Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) son unas enzimas, ampliamente distribuidas en los reinos animal y vegetal. Estas enzimas se dividen en tres grandes superfamilias: la superfamilia de peroxidasas animales, la superfamilia de las catalasas y la superfamilia de peroxidasas de plantas. Welinder (1992) hizo una clasificación interna diferenciando en la superfamilia de peroxidasas de plantas tres clases en función de sus diferentes elementos estructurales:

- **Clase I.** Peroxidasas de origen procariótico. Implicadas en procesos de detoxificación de las planta (eliminación de peróxido de hidrógeno). En este grupo podemos se encuentran la ascorbato peroxidasa (APXs) y la citocromo c peroxidasa (CcP).
- **Clase II.** Peroxidasas secretadas por hongos. Implicadas en procesos de degradación de lignina. En este grupo nos encontramos con la lignina peroxidasa (LiP) y la manganeso peroxidasa (MnP).
- **Clase III.** Peroxidasas secretadas por plantas. En este grupo es donde se están: la isoenzima c de la peroxidasa de rábano picante (HRP-C), la peroxidasa más estudiada hasta el momento, la peroxidasa de cacahuete (PNP), de cebada (BP) de semilla de soja (SBP) y las peroxidasas de palma real (RPTP), africana (AOPTP) y común (CEP), entre otras.

Todas ellas se caracterizan por tener un grupo prostético un grupo hemo tipo b (protoporfirina IX), con Fe (III) pentacoordinado, que constituye el centro activo de la enzima. En la Tabla 1.1, que se muestra a continuación, aparecen las características de las distintas clases de peroxidasas de plantas (Welinder, 1992):

Tabla 1.1. Características de las distintas clases de peroxidasa de plantas (Welinder, 1992).

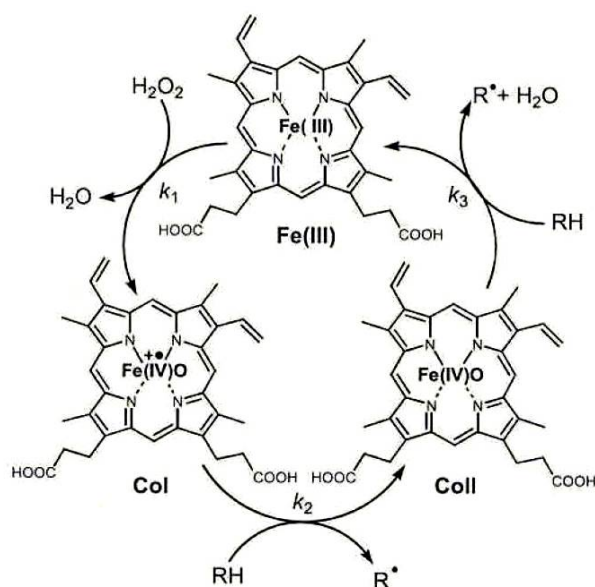
Elementos	Clase I	Clase II	Clase III
<b>Grupo hemo</b>	Si	Si	Si
<b>Carbohidratos</b>	No	0-5%	0-25%
<b>Iones metálicos</b>	No	Ca <sup>2+</sup> (2)	Ca <sup>2+</sup> (2)
<b>Puentes disulfuro</b>	No	4	4
<b>Señal peptídica de secreción</b>	No	En el extremo N-terminal	En el extremo N-terminal
<b>Propéptidos en el extremo C-terminal</b>	No	No	Si
<b>Hélices extra</b>	B' entre B-C	B' entre B-C	D' entre D-E F' y F'' entre F-G
<b>Ejemplos</b>	APXs	LiP, MnP	HRP-C, CEP, RPTPT, AOPTP

Las peroxidases de plantas superiores están implicadas en una gran variedad de procesos fisiológicos, a lo largo de todo el ciclo vital de la planta, desde el nacimiento a la senescencia, entre los que cabe citar: crecimiento, desarrollo y endurecimiento de la pared celular, lignificación y suberización, catabolismo de auxina y defensa frente al estrés oxidativo y el ataque de patógenos.

Las peroxidases de Clase III al poderse localizar en distintas partes de la planta y ser sintetizadas por distintos organismos, dan lugar a múltiples formas, denominadas isoenzimas. Así podemos clasificarlas en:

- Isoenzimas ácidas o aniónicas ( $pI < 7,0$ ). Con alto contenido en carbohidratos.
- Isoenzimas neutras o ligeramente básicas ( $7,0 < pI < 9,0$ ).
- Isoenzimas muy básicas o catiónicas ( $pI > 11,0$ ). Normalmente tienen muy poco contenido en carbohidratos.

Las peroxidases catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el peróxido de hidrógeno o un hidroperóxido orgánico como molécula aceptora de electrones (Figura 1.1). Las reacciones en las que están implicadas las peroxidases son reacciones bisustrato (Alberty, 1953) y siguen un mecanismo Ping Pong (Cleland, 1970, 1990).



**Figura 1.1. Ciclo catalítico de las peroxididasas.** Se muestra el centro activo de la enzima férrica nativa y de sus formas modificadas, el Compuesto I (CoI) y el Compuesto II (CoII).

Además de esta funcionalidad dentro de la planta, son unas enzimas que se utilizan ampliamente en la industria, así como en aplicaciones de síntesis de polímeros orgánicos como la polianilina (PANI), la decoloración de tintes sintéticos, la descontaminación y limpieza de aguas residuales y suelos, la síntesis de fármacos orgánicos con alto rendimiento, para la construcción de electrodos enzimáticos, kits de diagnóstico y enzimoimmunoensayos. En todos estos ensayos, la enzima utilizada por excelencia es la enzima de rábano picante (*Amoracia rusticana*).

Recientemente, la Comisión Científica de la Unión Europea ha definido a las peroxidasa como las proteínas con mayor interés biotecnológico para el siglo XXI, en especial por su potencial para conservar el medio ambiente. En esta línea, las peroxididasas pueden sustituir ventajosamente a algunos de los catalizadores químicos, agresivos o tóxicos, usados hoy en determinadas industrias. Así, a modo de ejemplos, pueden sustituir al cloro (agresivo) en el proceso de blanqueo del papel durante su reciclaje y, también, al formaldehído (mutagénico y cancerígeno) que se utiliza en la fabricación de resinas fenólicas.



Desde que se descubrió la elevada estabilidad de la HRP-C, se comenzó a utilizar en múltiples aplicaciones biotecnológicas y se comenzaron a estudiar cuáles eran los componentes estructurales responsables de esta gran estabilidad, comparándose con otras peroxidasas. Estudios posteriores de estabilidad con otras peroxidasas han demostrado que las peroxidasas de palma son mucho más estables que la peroxidasa de rábano (Rodríguez *et al.*, 2001, Zamorano *et al.*, 2008, Zamorano *et al.*, 2009) en un rango de pH más amplio.

Aunque son muchas las peroxidasas de Clase III que se han caracterizado bioquímicamente, son pocas las que tienen estructura tridimensional conocida. Hasta el momento, tan solo se conoce la estructura cristalográfica de la peroxidasa de rábano (Gadjhede *et al.*, 1997), la de cacahuete (Schuller *et al.*, 1996), la de la cebada (Henriksen *et al.*, 1998) y la de palma real (Watanabe *et al.*, 2010). El alto porcentaje de glicosilación dificulta su cristalización y protege en muchos casos de la digestión proteolítica. Además es conocido el bloqueo por piroglutamato del extremo N-terminal de muchas peroxidasas de Clase III.

Al conocer la versatilidad de estas enzimas y su elevada estabilidad térmica, química y frente a los cambios de pH, se empezaron a estudiar otras peroxidasas procedentes de distintas fuentes vegetales, y a día de hoy el espectro de conocimiento de estas enzimas es bastante amplio. Es cierto que algunas de estas enzimas no presentan ningún interés, pues no mejoran las características de la peroxidasa de rábano, pero otras, en cambio, abren un campo de estudio y de aplicación biotecnológica muy interesante, como son, las peroxidasas de palmas.

## PARTE II

### FUNDAMENTOS TEÓRICOS

*"(...) Lo más hermoso que podemos experimentar es el misterio. Es la fuente de todo arte y toda ciencia de verdad. Aquel para quien esta emoción es desconocida, aquel que ya es incapaz de detenerse para maravillarse y sentirse transportado por un sentimiento reverente, vale tanto como un muerto: sus ojos están cerrados (...)"*

*Albert Einstein. El mundo tal como lo veo. 1929. Este es mi pueblo.*



## 2.1. . PEROXIDASAS DE PALMA: UNA BREVE INTRODUCCIÓN

Las peroxidasas de palma se encuentran involucradas en la formación de la pared celular, en la regulación de las hormonas de la planta, en su mecanismo de defensa, y en respuestas a stress inducido por patógenos (Hiraga *et al.*, 2001). Son requeridas para superar las condiciones adversas medioambientales, bajo las cuales se producen un incremento de especies reactivas del oxígeno ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  y  $OH^{\cdot-}$ ).

Estas enzimas catalizan la oxidación de sustratos orgánicos, mientras se reduce el  $H_2O_2$  u otros peróxidos a agua en un ciclo catalítico de tres pasos que se conoce como mecanismo de Poulos-Kraut, lo que implica diferentes formas intermedias de la enzima (Poulos y Kraut, 1990). Para la mayor parte de las peroxidasas, los sustratos típicos son pequeñas moléculas tales como fenoles y aminas aromáticas. Sin embargo, es difícil imaginar qué sustratos son fisiológicamente relevantes para las peroxidasas de planta, debido a su capacidad para oxidar una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos (Savitsky *et al.*, 1999).

Las peroxidasas de palmeras pertenecen a la familia de las peroxidasas secretadas por vegetales (Clase III). Son enzimas constitutivas y solubles ya que contienen grupos glicanos covalentemente unidos por varias cadenas laterales de asparagina de una única cadena polipeptídica con alrededor de unos 300 residuos. Su centro catalítico alberga dos iones de calcio y un grupo prostético hemo localizado en la hendidura creada por dos  $\alpha$ -hélices antiparalelas. Rodeando el plano hemo, hay varios residuos aminoácidos altamente conservados que son esenciales para las propiedades catalíticas de las peroxidasas (Feng *et al.*, 2008; Ryan *et al.*, 2006).

Recientemente, se han purificado y caracterizado peroxidasas de hojas de palmeras tropicales (Feng *et al.*, 2008; Ryan *et al.*, 2006; Sakharov *et al.*, 2000; Sakharov *et al.*, 2001; Sakharov, 2003; Onsa *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2007). Estas enzimas muestran gran estabilidad a altas temperaturas, dentro de un rango bastante amplio de pH, así como

en presencia de peróxido de hidrógeno y de desnaturalizantes químicos (Sakharov y Sakharova, 2002; Rodríguez *et al.*, 2002; Zamorano *et al.*, 2008), haciéndolas interesantes para aplicaciones industriales. Debido a su alta estabilidad térmica, reactividad y estabilidad a valores bajos de pH, las peroxidasas de varias plantas se han utilizado en el desarrollo de biosensores para aplicaciones analíticas (Regalado *et al.*, 2004; Alpeeva *et al.*, 2005). Entre las peroxidasas de clase III que se han caracterizado estructuralmente y bioquímicamente están las peroxidasas de palmera real *Roystonea regia* (RPTP), palmera *Chamaerops excelsa* (CEP), palmera africana *Elaeis guineensis* (AOPTP), palmera del viento *Trachycarpus fortunei* (WPTP) que han demostrado ser las más estables (Sakharov *et al.*, 2001; Sakharov, 2003; Caramyshev *et al.*, 2006).

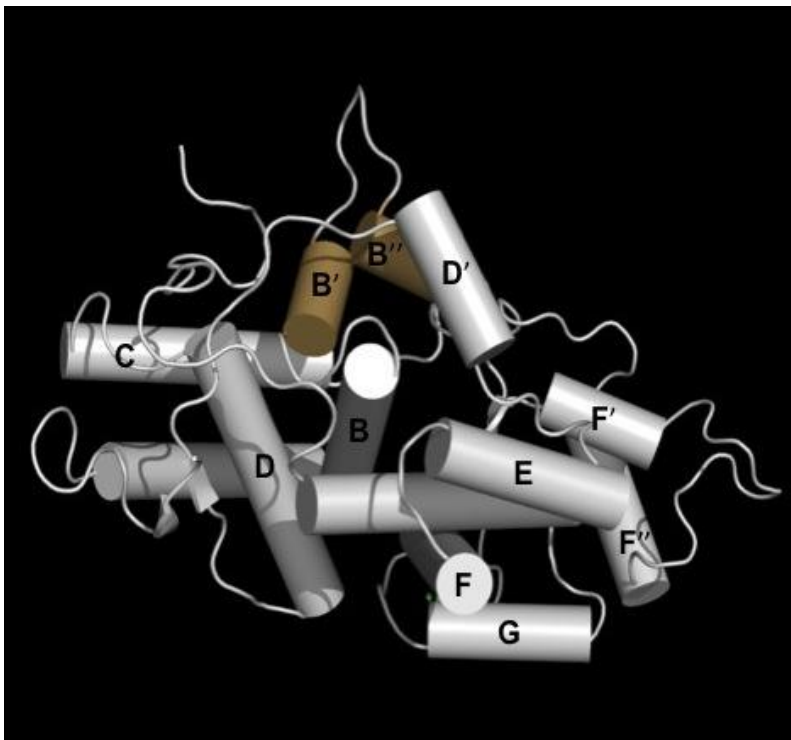
## 2.2. SUPERFAMILIA DE LAS PEROXIDASAS DE PALMA

Welinder (1992) clasificó las peroxidasas de plantas en tres grupos básicos en función de sus diferentes grupos estructurales. Pero aquí y ahora pondremos especial atención en las peroxidasas de Clase III y quienes deseen saber un poco más acerca de esta clasificación general de peroxidasas pueden consultarlo en trabajos previos de este grupo (Zamorano *et al.*, 2007, Zamorano, 2009). Las peroxidasas de Clase III tienen una estructura secundaria rica en  $\alpha$ -hélices separadas por bucles y giros de longitud variable. Estas peroxidasas (EC 1.11.1.7) tienen dos iones calcio, un péptido señal en el N-terminal, cuatro puentes disulfuro bien conservados, un conjunto de hélices que juegan un papel importante en el acceso del sustrato al sitio activo, un nivel de glicosilación que se encuentra entre 0-25%, y un propéptido en el C-terminal responsable de dirigir las peroxidasas a las vacuolas (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Características de la Clase III de peroxidasas y de las peroxidasas de palma (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011c)

Superfamilia de las peroxidasas		
	Clase III	Clase X
Grupo hemo	Si	Si
Carbohidratos	0-25%	24-25%
Iones metálicos	Ca <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
Puentes disulfuro	4	4
Señal peptídica de secreción	Extremo N-terminal	Extremo N-terminal
Propéptidos en el C-terminal	Si	Si
Hélices adicionales	D' entre D-E F' y F'' entre F-G	B' y B'' entre B-C D' entre D-E F' y F'' entre F-G
Ejemplos	cHRP, PNP, BP1, TcPX, RPPX	RPTP, CEP

Desde el punto de vista estructural, las peroxidasas de palma tienen una serie de hélices adicionales que no tienen otras peroxidasas de la Clase III. En la RPTP, y en la CEP se han encontrado dos pequeñas hélices, B' y B'', que aparecen insertadas entre las hélices B y C (Figura 2.1). Como en otras peroxidasas de Clase III, las peroxidasas de palma tienen dos  $\beta$ -lámina cortas,  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , que se encuentran insertas entre las hélices F y G, las cuales contienen las hélices F' y F''. Hay cuatro puentes disulfuro basados en los pares de residuos invariantes de cisteína (Cys), dando rigidez a la estructura (Watanabe *et al.*, 2010). Si nos basamos en las diferentes clases de peroxidasas (Zamorano *et al.*, 2007), se puede observar que las principales características que diferencian la Clase II de la Clase III de peroxidasas es la presencia de las hélices adicionales. La Clase II únicamente tiene una hélice B' adicional entre B-C. y la Clase III tiene una D' entre D-E, una F' y una F'' entre F-G y los propéptidos del C-terminal. En resumen, las peroxidasas de palma exhiben todas las características del grupo Clase III, junto con las dos hélices adicionales. Por ello, proponemos un nuevo grupo de peroxidasas: la superfamilia de las peroxidasas de palma (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011c).



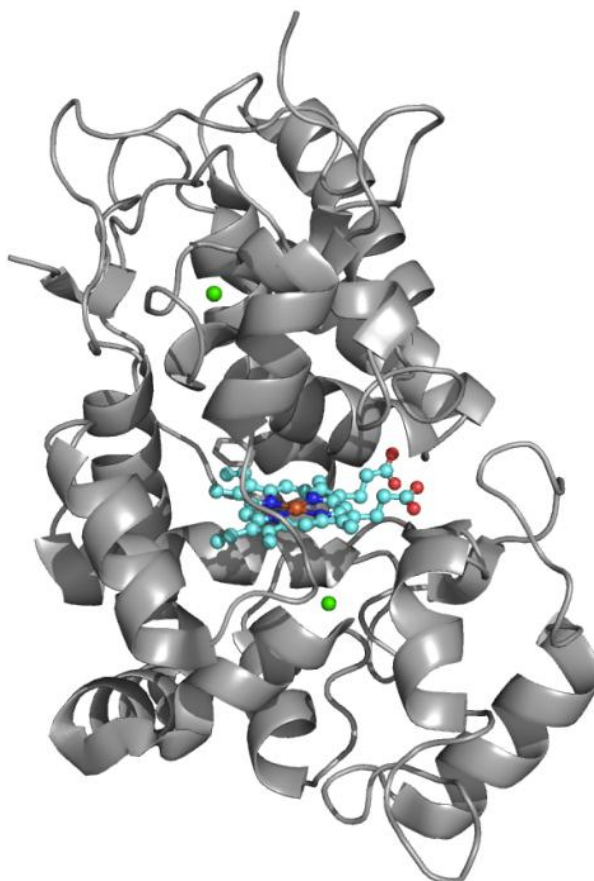
**Figura 2.1.** Diagrama en cinta (*Ribbon diagram*) de RPTP (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011c). Conservando las hélices que aparecen en gris con respecto a las peroxidasas de clase III y destacando en marrón las nuevas hélices que aparecen para las peroxidasas de palma.

### **2.3. COMPONENTES ESTRUCTURALES DE LAS PEROXIDASAS DE PALMERA**

El número de estructuras cristalinas de peroxidasas que han sido elucidadas por difracción de rayos-X es bajo (Zamorano *et al.*, 2007). Problema significativo para la cristalización de las peroxidasas es el alto nivel de glicosilación de este grupo de enzimas. Este inconveniente, evidentemente, incluye a las peroxidasas de palmera, cuyo grado de glicosilación es aún mayor en comparación con otras peroxidasas. La estructura tridimensional de la de RPTP muestra nueve sitios de glicosilación (Watanabe *et al.*, 2007) y estudios preliminares de la CEP también muestran el mismo número de sitios. Por otro lado, HRP-C, SBP y PNP tienen siete, cinco y tres cadenas de glicanos respectivamente. El hecho de que se incremente la glicosilación favorece la solubilidad de la

peroxidasa en soluciones acuosas y mejora la estabilidad de la peroxidasa frente a la proteólisis (van Huystee *et al.*, 2004).

Al igual que otras peroxidasas, las de palma tienen cadenas polipeptídicas con alrededor de 300 residuos aminoácidos, un sitio activo con un grupo prostético donde un ión Fe(III) está coordinado con dos iones calcio (Figura 2.2), y ocho sulfidrilo formando cuatro puentes disulfuro invariantes entre las Cys 11-91, 44-49, 97-299 y 176-208 (Watanabe *et al.*, 2010). El hierro y los iones calcio son esenciales para la estructura e integridad funcional de la enzima. Los sitios de glicosilación están sobre la superficie del bucle conteniendo la  $\alpha$ -hélice y siempre en el borde exterior de la proteína.



**Figura 2.2. Representación en tres dimensiones de la estructura de rayos-X de la peroxidasa de palma (RPTP PDB code 1HDL) (Watanabe *et al.*, 2010).** El grupo hemo se encuentra representado en el centro de la estructura en color turquesa, correspondiendo con el anillo de protoporfirina y el ión Fe(III) en rojo, encontrándose en el centro de la estructura. El grupo hemo se encuentra localizado entre los dominios distal y proximal, los cuales contienen un ión Ca(II) cada uno de ellos (en verde).



La estructura secundaria está principalmente compuesta por  $\alpha$ -hélices y un pequeño número de  $\beta$ -láminas cortas. Las peroxidases de palma tienen diez  $\alpha$ -hélices (A-J) ocupando los sitios de similar topología en todas las peroxidases de Clase III. Una diferencia significativa entre la Clase III y la nueva Clase de las peroxidases de palma es que la última contiene dos  $\alpha$ -hélices adicionales (B' y B'') que juegan un papel todavía hoy desconocido sobre la estabilidad de las proteínas. La integridad estructural de esta región de la proteína se mantiene por el puente disulfuro entre Cys44 y 49.

Es posible que los diferentes residuos de la  $\alpha$ -hélice B' jueguen un papel importante en la accesibilidad del sustrato para unirse al centro activo.

Al igual que otras peroxidases de la Clase III, las peroxidases de palma tienen dos dominios – el distal y el proximal - encontrándose el grupo hemo en el centro (Figura 2.2),

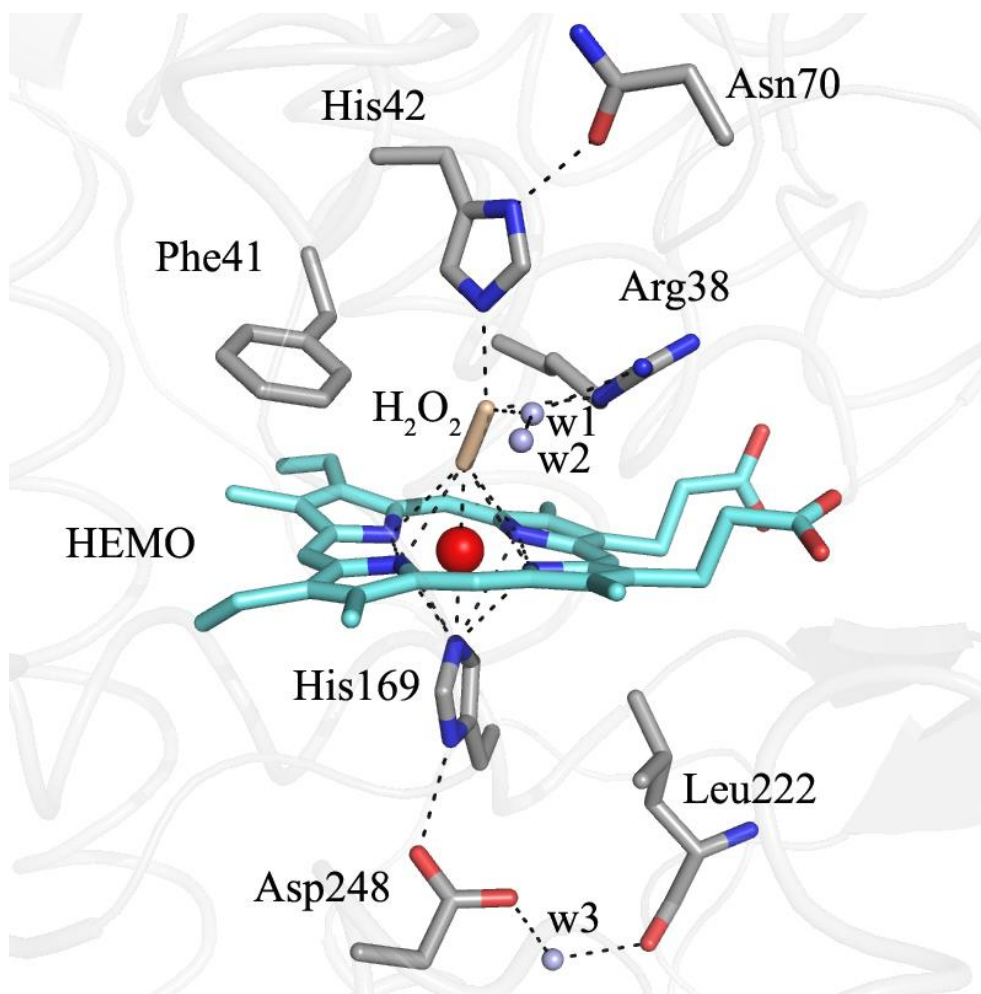
### **2.3.1. EL CENTRO ACTIVO**

Como en el caso de las peroxidases de Clase III, las peroxidases de palma contiene dos tipos diferentes de centros metálicos: Fe(III)-protoporfirina IX, generalmente denominado como “grupo hemo” y dos iones de calcio (Tabla 2.1, Figura 2.2). Ambos son esenciales para la integridad estructural y funcional de la enzima.

El centro activo del grupo hemo de las peroxidases de palma se asemeja mucho al de la peroxidasa aniónica HRP-C y al de la catiónica SBP, mostrando que el átomo de hierro no se desplaza del plano central y está coordinado a moléculas de peróxido de hidrógeno. La distancia de la banda de peróxido oxígeno-oxígeno corresponde a un enlace simple y apoya la idea de que las estructuras cristalinas de la peroxidases de palma no definen su estado de reposo. El estado de reposo de la enzima contiene un ión Fe (III) con un enlace débil del ligando agua que se sustituye por

una molécula de  $H_2O_2$ . Por lo tanto, la estructura del cristal tridimensional de las peroxidasas de palma corresponde a un estado hidroperóxido complejo, que, de acuerdo con el mecanismo de reacción de Poulos y Kraut (1980), es un estado de transición del intermedio formado antes del Compuesto I (Watanabe *et al.*, 2010).

Los residuos conservados en las peroxidasas de Clase III responsables del mantenimiento de la estructura del grupo hemo son los que se indican a continuación. En el dominio distal del plano del grupo hemo, el grupo  $NH_2$  de la Arg38 ayuda a la estabilización a través de una molécula de agua durante la formación del complejo peroxidasa: $H_2O_2$ ; la Phe41 previene el acceso al hierro del grupo hemo; el átomo  $N\epsilon_2$  de la His42 actúa como un aceptor de protones, puesto que el  $H_2O_2$  se enlaza con la vacante del sexto centro de coordinación del hierro hético, y la Asn70, que es un residuo conservado en las peroxidasas de Clase III. En el dominio proximal del plano del grupo hemo, tanto His169, coordinada al átomo de hierro a través de su cadena lateral al átomo  $N\epsilon_2$ , como Asp248, cuyo grupo carboxilato constituye puente de hidrógeno con la  $N\delta_1H$  de la His169, juegan un papel importante en la estabilización de los estados oxidados del átomo de hierro (Figura 2.3). En las peroxidasas de palmera, el átomo peróxido de  $O_2$  forma enlaces de hidrógeno con el átomo  $N\epsilon_2$  de la His42, con el átomo  $N\epsilon$  de la Arg38 y con una molécula de agua w1. W1 es el enlace de hidrógeno de la cadena lateral de  $NH_2$  de la Arg38 y otra molécula de agua w2. Las dos moléculas de agua w1 y w2 están conservadas en la cavidad distal del hierro que contienen las peroxidasas de Clase III y que juega un papel importante en la catálisis ácido-base de las moléculas (Figura 5.3) (Banci, 1997).



**Figura 2.3. Residuos aminoácidos clave en la región de unión del grupo hemo de las peroxidasas de palma (Watanabe *et al.*, 2010).** El grupo hemo se encuentra en la parte central, el ión hierro (en color rojo) se encuentra en el centro del anillo de protoporfina IX (color turquesa).. A ambos lados del grupo se encuentran unas pequeñas esferas de color violeta, que son las moléculas de agua (w1, w2 y w3). En lado distal, se observa una barrita de color marrón que se corresponde con la molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conservada.

Una comparación estructural de todas las peroxidasas vegetales elucidadas por rayos-X muestran que hay sólo una interacción distinta del hemo con el propionilo de la proteína. En HRP-C, un residuo glutamina (Q176) tiene un enlace de hidrógeno al hemo propionilo situado cerca de la entrada del canal de acceso al sustrato. Sin embargo, en las peroxidasas de palma, el mismo propionato está unido por enlace de hidrógeno a la His175 y a la Ser178 (estructuralmente equivalente a la Phe179 de HRP-C) y conservando una molécula de agua (w7) que se encontró en las estructuras 3D de ambas peroxidasas, HRP-C y peroxidasa de palmera.

Curiosamente, la orientación de los propionatos hémicos en la peroxidasa aniónica de palmera y de SBP se encuentra retorcida, mientras en las peroxidases catiónicas (HRP-C y PNP) lo propionatos cargados son paralelos entre sí. Estas diferencias en la interacciones del grupo propionil hético y la proteína entre peroxidases de Clase III pueden influir sobre la estabilidad y propiedades catalíticas de estas enzimas (Watanabe *et al.*, 2010). Por lo tanto, los propionatos del grupo hemo juegan un papel importante en la estabilidad de la cavidad hémica y en la formación de los intermedios catalíticos. Las peroxidases de palma también contienen una parte distal y una proximal de unión a los centros de calcio, que son idénticos a los de la Clase II y Clase III de peroxidases (Banci, 1997; Gadjhede, 2001; Poulos, 2006; Poulos y Fenna, 1994; Ryan *et al.*, 2006; Veitch, 2004a; Welinder, 1992).

### **2.3.2. LOS GLICANOS**

La Clase III de peroxidases son glicoproteínas con un porcentaje de glicosilación de 0-25%. En las peroxidases de palma, el total de carbohidratos que contienen las moléculas en estado nativo es de 24,3%. Los glicanos son esenciales para el mantenimiento de la estabilidad y actividad, incrementan la hidrofobicidad y la protección de la proteína a la proteólisis. Los glicanos están compuestos por cinco clases diferentes de azúcares: N-acetil glucosamina, xilosa, manosa, fucosa y galactosa, con una longitud de 7 a 14 azúcares, siendo la masa promedio de azúcares 176 kDa. Los puntos de enlace de los glicanos en las proteínas son los residuos Asn. Cada peroxidasa tiene su propio porcentaje de glicosilación.

Al igual que muchas otras peroxidases de la Clase III, las peroxidases de palmera, en estado nativo, están altamente glicosiladas y sus estructuras tridimensionales muestran que todos los sitios de N-glicosilación se encuentran dentro de la superficie de giro o de las regiones de los bucles conectados con las hélices a las cadenas de los glicanos que sobresalen del disolvente. Estudios sobre RPTP (Watanabe *et al.*, 2010) y preliminares

sobre CEP han demostrado que estas peroxidasas contienen en su estructura nueve N-glicanos ligados covalentemente unidos a Asn8, Asn28, Asn114, Asn144, Asn154, Asn211, Asn256 y Asn298, mientras que HRP-C tiene 8 sitios de glicosilación situados entre los bucles Asn13, Asn57, Asn157, Asn186, Asn198, Asn214, Asn255 y Asn268 (Veitch, 2004b). Las cadenas de glicanos de las proteínas peroxidasa de palma contienen N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), manosa (Man), fucosa (FUC) y xilosa (XYL). Hay tres secuencias de las cadenas de glicanos que han sido determinados previamente como Man-[XYL]Man-Man-GlcNAc-[Fuc]GlcNAc. Por lo tanto, la cadena de glicanos más abundante que se encontró fue para RPTP. La estructura por rayos-X revela que es Man-[Xyl]Man-Man-GlcNAc-[Fuc]GlcNAc, la cual se adjuntó a Asn8 (Watanabe *et al.*, 2010). La forma altamente glicosilada de la peroxidasa RPTP o de otras peroxidasas impide la cristalización, pero por otro lado los glicanos hidrofílicos mejoran su solubilidad y protegen de la proteólisis. Además, la distribución entre las glicofomas normalmente no es homogénea.

## 2.4. ESTABILIDAD DE LAS PEROXIDASAS DE PALMA

Tras el descubrimiento de la alta estabilidad de HRP, surgieron un número creciente de aplicaciones biotecnológicas, por ello los esfuerzos en investigación se dirigen a la determinación de los componentes estructurales responsables de tan alta estabilidad. En los últimos 15 años, se han encontrado varias peroxidasas de hojas de plantas tropicales que son mucho más estables que la HRP. Este es el caso del grupo de las peroxidasas de hojas de palmeras (Sakharov, 2003).

Se han investigado los efectos que los diferentes elementos estructurales ejercen sobre la estabilidad de peroxidasa, concluyéndose que el catión  $\text{Ca}^{2+}$ , los puentes disulfuro, los glicanos y varios residuos aminoácidos en el sitio activo son factores esenciales para la estabilidad térmica y química de este tipo de enzimas (Zamorano *et al.*, 2007).

La investigación más detallada sobre la estabilidad térmica de diferentes peroxidasas se ha llevado a cabo a pH 3,0, debido al gran interés que se tiene en la aplicación de estas enzimas en la síntesis industrial de polímeros conductores, proceso que es más eficaz a pH inferior a 4 (Lui *et al.*, 1999; Nagaran *et al.*, 2001; Caramyshev *et al.*, 2005).

La desnaturalización térmica de las peroxidasas a este valor de pH dio lugar a transiciones bien definidas, cuyos parámetros dependen de la velocidad de barrido de la temperatura. Bajo estas condiciones experimentales, el proceso de desnaturalización fue siempre irreversible, ya que no se observó efecto térmico en un segundo calentamiento de la solución enzimática. Todo esto indica claramente que las transiciones térmicas observadas caracterizan un proceso irreversible controlado cinéticamente. El análisis de las transiciones de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para las peroxidasas de palma se ha llevado a cabo sobre la base de un sencillo modelo irreversible de dos estados  $N \xrightarrow{k} D$ , en el que sólo los estados nativo (N) y final (irreversiblemente desnaturalizado) (D) están significativamente poblados, y en el que la constante de primer orden ( $k$ ) de conversión de N a D exhibe una fuerte dependencia con la temperatura, según la ecuación de Arrhenius. En la Tabla 2.2 se muestran los valores tan elevados de energía de activación del proceso de desnaturalización  $E_A$  para las peroxidasas de palma en comparación con la peroxidasa de referencia HRP, así como los valores de la temperatura ( $T^*$ ) para la que  $k$  es igual a  $1 \text{ min}^{-1}$ , valores obtenidos por ajuste de regresión no lineal de los datos experimentales al modelo irreversible de dos estados.

**Tabla 2.2. Parámetros estimados de la ecuación de Arrhenius para el modelo simple de dos estados en la desnaturalización térmica de las peroxidasas de palma a pH 3 (Pina *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2002; Zamorano *et al.*, 2008; Zamorano *et al.*, 2009).**

	$T^*$ (K)	$E_A$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
<b>AOPTP</b>	347,5 ± 0,3	103 ± 6
<b>CEP</b>	345,0 ± 0,2	105,1 ± 1,7
<b>RPTP</b>	342,0 ± 0,2	129,1 ± 0,8
<b>HRP</b>	344,4 ± 0,5	38,2 ± 0,5

Los cambios en el espectro de dicroísmo circular (CD) de las proteínas alrededor de 222 nm se corresponden con cambios en su estructura secundaria. Esta banda CD es la banda correspondiente a los péptidos y residuos aromáticos. Los cambios en el espectro CD alrededor de los 400 nm (banda Soret) corresponden a cambios en la estructura terciaria alrededor del grupo hemo. Con CD es posible estimar el contenido en los componentes de la estructura secundaria de la proteína. La tabla 3 muestra la estructura secundaria (en % de componentes) para las peroxidasas de clase III y peroxidasas de palma en forma nativa y desnaturalizada. Los componentes de la estructura secundaria de la peroxidasa de palma en estado nativo a pH 3 se encuentran alrededor de  $39\pm 1\%$   $\alpha$ -hélices,  $9\pm 2\%$   $\beta$ -láminas,  $21\pm 1\%$   $\beta$ -giro y un  $30\pm 3\%$  en estructuras desordenadas. En el caso de la peroxidasa de palma en estado desnaturalizado al mismo valor de pH contiene  $10\pm 2\%$   $\alpha$ -hélices,  $24\pm 4\%$   $\beta$ -láminas,  $15\pm 1\%$   $\beta$ -giro y un  $51\pm 4\%$  en estructuras desordenadas. En el caso de las peroxidasas de palma (CEP y RPTP) existen grandes diferencias con respecto a las otras hemoperoxidasas en la cantidad de estructura en  $\beta$ -lámina. Este incremento en  $\beta$ -lámina también ocurre en el caso de la desnaturalización de proteínas, indicando que la enzima se encuentra en estado de agregación probablemente de carácter intramolecular. Los valores obtenidos para la forma intacta de CEP y RPTP son típicas de las diferentes hemo peroxidasa (Banci, 1997). Se ha observado que las estimas de las  $\beta$ -láminas y los  $\beta$ -giros son generalmente peores que las estimas de las  $\alpha$ -hélices ya que la intensidad de elementos estructurales de tipo  $\beta$  es menor la de los elementos en  $\alpha$ -hélices (Venyaminov y Yang, 1996). Al calentar la CEP y la RPTP hasta temperatura de desnaturalización de la proteína, la forma del espectro cambia (Zamorano *et al.*, 2008; 2009), apuntando a un incremento en estructuras desordenadas, principalmente a expensas de la estructura en  $\alpha$ -hélice (Tabla 3). El incremento en la cantidad de  $\beta$ -lámina que también ocurre en la desnaturalización de peroxidasas de palma, indicando algún estado de agregación, probablemente de naturaleza intramolecular ya que no se detectó incremento en la turbidez en el proceso de desnaturalización.

**Tabla 2.3 Estructuras secundarias por espectroscopia CD para las formas nativa y desnaturalizada de algunas peroxididasas a pH 3 (Hidalgo Cuadrado et al., 2011c).** N es la estructura en estado nativo y D la estructura en estado desnaturalizado.

	AOPTP		CEP		RPTP		HRP		aPrx	
	N	D	N	D	N	D	N	D	N	D
<b><math>\alpha</math>-hélice</b>	15	12	38	10	41	8	42	27	47	30
<b><math>\beta</math>-lámina</b>	38	23	7	28	12	20	11	17	6	9
<b><math>\beta</math>-giro</b>	20	14	22	15	20	16	21	18	27	23
<b>Desordenada</b>	40	50	33	47	27	56	26	38	20	37

## 2.5. CINÉTICA DEL ESTADO ESTACIONARIO

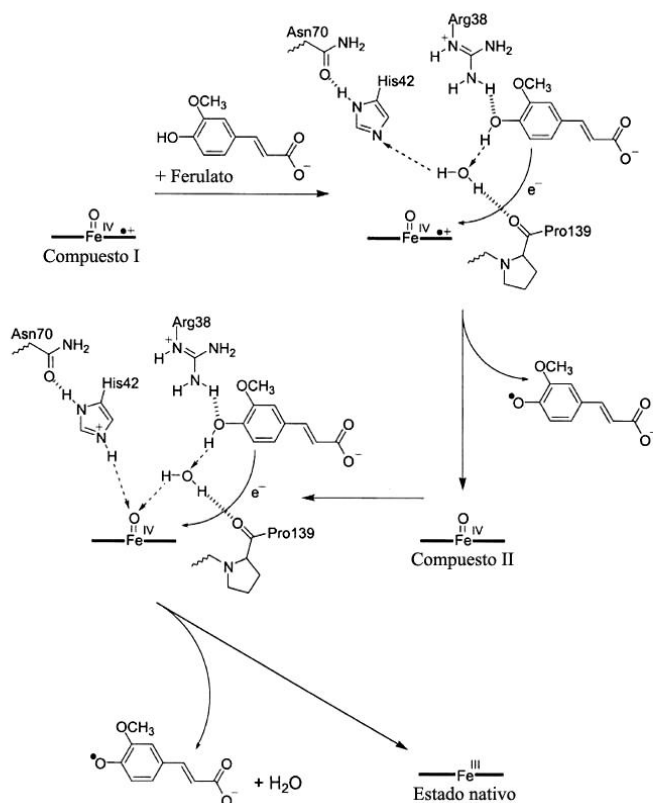
Las peroxididasas catalizan la oxidación de sustratos orgánicos mientras se reduce el  $H_2O_2$  (u otros peróxidos) a agua en un ciclo de tres pasos catalíticos, los cuales involucran formas intermedias de la enzima (Poulos, 1980):



donde E es la enzima nativa. La oxidación monoelectrónica del estado nativo E (Ecuación 2.1) da lugar a un estado intermediato denominado Compuesto I (CoI), descrito como radical  $\pi$ -catión oxiferril profirina. CoI acepta un electrón y un protón desde el sustrato reductor ( $AH_2$ ), produciendo un radical libre ( $AH^\bullet$ ) y el intermedio hemo oxiferrilo conocido como compuesto II (CoII). La subsecuente reducción de un electrón del CoII por una segunda molécula de sustrato reductor produce la forma férrica de la peroxidasa (E). La constante microscópica  $k_1$  (constante de formación del compuesto I) indica la reactividad de la enzima hacia el peróxido de hidrógeno y la  $k_3$  (constante de reducción de CoII) la reactividad de la enzima en relación al sustrato reductor.



En la Figura 5.4 se puede observar el mecanismo de reducción de los compuestos I y II del HRP-C para llegar al estado nativo de la enzima, que se lleva a cabo en el lado distal del centro activo de la proteína.



**Figura 5.4. Mecanismo para la reducción de los compuestos I y II de HRP-C con ácido ferúlico (ferulato a pH neutro) como sustrato reductor (Veitch, 2004).** Se han remarcado los papeles de los residuos del grupo hemo, así como de una molécula de agua y de la Pro139 que se encuentran en el lado distal. Las flechas discontinuas indican la dirección de transferencia del protón, y las flechas continuas la transferencia del electrón.

Siguiendo la nomenclatura de Cleland (Cleland, 1970), este ciclo catalítico es un mecanismo irreversible Ping Pong. Cuando la reacción es irreversible, la velocidad de la reacción del compuesto es mayor que la de disociación. Aparentemente, la reacción global no tiene límites para esta velocidad, a mayor concentración de sustrato, mayor velocidad de la reacción. Recientemente estudios con peroxidasas de palma, CEP (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011b) y RPTP (Zamorano, 2009) demuestran que éste es un mecanismo Ping Pong Bi-Bi. Las constantes microscópicas de las

peroxidasas de palma indican que muestran mayor afinidad a pH ácidos que otras peroxidasas de Clase III. Esto muestra de nuevo que esta clase de peroxidasas es más estable que las otras. (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011a).

## 2.6. INACTIVACIÓN SUICIDA DE LAS PEROXIDASAS

A pesar de las peculiaridades que distinguen las diferentes peroxidasas, se puede proponer un mecanismo común de inactivación que comprende varias etapas. Las peroxidasas en ausencia de sustrato, o cuando se exponen a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, muestran un comportamiento cinético de inactivación suicida, donde el peróxido de hidrógeno es el sustrato suicida que convierte el CoII en un compuesto radical libre porfirínico peroxi-hierro(III) altamente reactivo, denominado Compuesto III (CoIII). El CoIII no forma parte del ciclo pero se produce bajo una excesiva exposición del compuesto protonado CoII a especies oxidantes en una reacción parcialmente mediada por radicales libres superóxido (Nakajima y Yamakazi, 1987; Adediran y Lambeir, 1989; Keilin y Mann, 1937). Los análisis de captura de spin y espectrales de ESR han demostrado la formación de estas especies tras el tratamiento oxidativo de la HRP (Adediran y Lambeir, 1989)

Los modelos cinéticos para la inactivación por peróxido de hidrógeno de la HRP y de las peroxidasas de palma son similares en la dependencia con respecto al tiempo y muestran curvas cinéticas de saturación. A partir de la estequiometría de la inactivación suicida, se concluye que primera peroxidasa que se utilizó para la síntesis de PANI fue la HRP, pero esta enzima se encontró que presentaba una baja afinidad por la anilina y que perdía parte de su actividad catalítica a valores de pH inferiores a 4,5 (Cattopadhyaya y Mazumdar, 2000; Pina *et al.*, 2001). Por todo ello, se ha utilizado una peroxidasa estable al pH y aislada de las hojas de palmera para la síntesis enzimática de PANI (Vorobiev *et al.* 2005), lo que supondría un nuevo enfoque en la construcción de este tipo de electrodos. La principal ventaja de este enfoque es que la síntesis de la

polianilina se produce en condiciones favorables al medio ambiente y fáciles de controlar.

## 2.7. APLICACIONES POTENCIALES

Debido a la notable resistencia a la inactivación por  $H_2O_2$ , comprobada para diferentes sustratos, en comparación con la de otras peroxidasas estudiadas hasta la fecha y que se utilizan en diferentes aplicaciones, la peroxidasa CEP puede considerarse un buen candidato para su uso en procesos que impliquen oxidación, así como en las enfermedades de Refsum y el Alzheimer o incluso en procesos de envejecimiento (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011c).

Otro punto importante son las terapias para el cáncer en las que se usa ácido 3-indol-acético (IAA) y donde la peroxidasa de palma se podría combinar, ya que se pueden ofrecer nuevas posibilidades en este proceso de acuerdo con Wardman y colaboradores (Folkes y Wardman, 2001; Greco *et al.*, 2001; Wardman, 2002). Estos autores observaron que el IAA es citosólico para las células de mamíferos, en presencia de HRP-C. La peroxidasa de palma se podría utilizar en estos experimentos, ya que exhibe una alta afinidad, mayor que la de HRP-C.

Pues hemos demostrado que CEP tiene mayor afinidad a sustratos con H aceptores, y como IAA tiene 3 H aceptores, lo convertiría en un buen candidato para este tipo de aplicaciones (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011c).

## PARTE III

### OBJETIVOS

*"(...) Questo que en toda investigación sobre las cosas que tienen principios, causas o elementos, el saber y la ciencia resultan del conocimiento de éstos -ya sólo creemos conocer una cosa cuando conocemos sus primeras causas y sus primeros principios, e incluso sus elementos-, es evidente que también en la ciencia de la naturaleza tenemos que intentar determinar en primer lugar cuanto se refiere a los principios."*

*Aristóteles. Física. Libro I. 184<sup>a</sup>.*



A lo largo del siglo XX muchos han sido los grupos de investigación que han caracterizado bioquímicamente nuevas peroxidasas procedentes de diferentes fuentes, en su mayor parte, vegetales, tales como cacahuete, tabaco, rábano, maíz, soja, tomate, cebada, arroz, nabo, alcachofa y algunas especies ornamentales como los geranios, entre otras especies. Sus estudios se han basado mayoritariamente en purificar estas enzimas y hacer estudios de estabilidad frente al pH, la temperatura y diferentes agentes químicos desnaturalizantes.

En la década de los noventa, el grupo de I. Sakharov, en la Universidad Industrial de Santander (Colombia), comenzó a aislar y estudiar las peroxidasas de especies tropicales (palmas), cuando se conoció su elevada estabilidad.

A los pocos años nuestro grupo inició los estudios de estabilidad de este tipo de peroxidasas (palma africana, palma real y palma *Chamaerops excelsa*), así como de la estabilidad de las peroxidasas de rábano picante y la aniónica de cacahuete como peroxidasas de referencia. Las peroxidasas de palma demostraron ser enzimas termoestables en un amplio intervalo de pH en el que son activas, poseyendo, además, una actividad catalítica en diferentes situaciones experimentales. La elevada estabilidad que poseen en intervalos de pH bajos, las hacen apropiadas para muchas aplicaciones biotecnológicas en condiciones amigables para el medioambiente. Por este motivo, nuestro grupo sistemáticamente ha realizado estudios de estabilidad a pH 3,0, pH en el que la enzima retiene el 100% de su actividad además de su estructura nativa intacta.

Los objetivos del trabajo son:

- Optimizar el proceso de purificación para la peroxidasa de palma *Chamaerops excelsa*, para la obtención de la proteína con una calidad de pureza óptima para posteriores estudios.
- Caracterizar bioquímicamente la peroxidasa de palma *Chamaerops excelsa*, determinando su masa molecular, punto isoeléctrico, factor  $R_z$  y estado de agregación.
- Llevar a cabo el estudio de estabilidad térmica de la enzima a pH 3, utilizando como metodología de seguimiento la Calorimetría diferencial de Barrido (DSC) para, así, poder

caracterizar su proceso de desnaturalización, y en el caso de ser reversible, calcular sus parámetros termodinámicos.

- Comparación de los resultados de estabilidad térmica obtenidos por la metodología DSC, con los obtenidos mediante las metodologías de dicroísmo circular (CD) y fluorescencia intrínseca de proteínas.
- Estudiar la estabilidad de la enzima frente a los cambios de pH.
- Determinar la estructura secundaria de la peroxidasa mediante espectroscopia de dicroísmo circular.
- Estudio del estado estacionario y de inhibición por sustrato de la enzima y cálculo de sus parámetros cinéticos.
- Estudio de inactivación por sustrato suicida.
- Análisis del mecanismo cinético que sigue la peroxidasa en su reacción de oxidación.
- Análisis cristalográfico de la proteína: Sistema de cristalización y grupo espacial.

El objetivo final es definir una enzima con unas características espectrales mucho mejores que las de la peroxidasa de rábano picante, capaz de sustituirla en la mayor parte de sus aplicaciones biotecnológicas. Una enzima más estable permitiría realizar los procesos más eficazmente y en mejores condiciones de pH y temperatura, lo que sería rentable y, además, beneficiosa para el Medio Ambiente.

## **PARTE IV**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

*"La razón humana debe construir en primer lugar las formas, antes de poder comprobar las cosas ... El saber no puede surgir de la mera experimentación sino que surge de la comparación entre lo ideado y lo observado"*

*Albert Einstein*





## 4.1. MATERIAL

### 4.1.1. PURIFICACIÓN

- Agitadores magnéticos.
- Aparato de electroforesis vertical en placa (Bio-Rad laboratorios, Hercules, CA).
- Balanza analítica Precisa 40SM-200 (PAG Oerlikon AG, Zurich CH-8050, Suiza).
- Baño termostático Neslab RT-11 (thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA).
- Baño Speed-Vac Savant (GMI, Inc. Minnesota 55303, USA).
- Bomba de vacío.
- Cassettes de diálisis de MWCO 7000 (0,5-3 mL), MWCO 10000 (12 mL) y MWCO 10000 (0,1-0,5 mL) (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL).
- Centrífonas Amicon Ultra 15 de MWCO 10000 y 30000 (Millipore corp., Billerica, MA).
- Centrifuga refrigerada Sorvall RC-5B Superspeed (E.I. du Pont Instruments Canadá Company, Ontario L5M2H3, Canadá).
- Centrifuga Allegra™21R (Beckman Coulter, Fullerton, CA 92834-3100, USA).
- Columna cromatográfica con camisa de 1.5 x 10 cm (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).
- Columna cromatográfica de 0.5 x 10 cm (Bio-Rad laboratorios, Hercules, CA).
- Columna cromatográfica de Superdex 200 10/30 HR (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia).
- Columna cromatográfica de fase reversa Lichrosphere RP100C<sub>18</sub> (250 x 4 mm, 5 µm de tamaño de partícula) (Amersham Biosciences).
- Conductímetro ATC HI 9835 (PCE Group Ibérica S.L., 02500, Albacete, España).
- Liofilizador Benchtop 3L (The Virtis company, INC. Gariner, New York 12525, USA).

- Membrana de diálisis de celulosa de 76 mm de anchura que retiene proteínas con un peso molecular > 12000 Da (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO 63103, USA).
- Picadora doméstica (Grupo Moulinex, 92979, París, Francia).

#### 4.1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA

- Cubetas de cuarzo para fluorescencia de 1 x 2 y 0.2 x 2 cm (Hellma GMBH and Co. KG, Müllheim, Alemania).
- Cubetas de absorción de cuarzo de 1 x 2 y 0.2 x 2 cm (Hellma GMBH and Co. KG, Müllheim, Alemania).
- Digestor proteico ProGest (Genomic Solutions Inc. Ann Arbor, MI 48108, USA).
- Equipo FLPC ÄKTA (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia).
- Equipo ETTAN™ LC HPLC (Amersham Biosciences).
- Espectrofluorímetro Hitachi F-4010 (Hitachi Co., Ltd. Tokio, Japón).
- Espectropolarímetro Jasco J-715 (JASCO Inc., Easton MD).
- Filtros de 0,22 µm, 47 mm (Millipore corp., Billerica, MA)
- Fuente de corriente 500V/2,5A/500W (bioRad Laboratories, Hercules, CA).
- IE Model 111 Mini IEF Cell (BioRad Laboratories, Hercules, CA).
- Jeringas (Hamilton Company CH-7402 Bonaduz, GR, Suiza)
- Material de uso corriente en un laboratorio de Bioquímica.
- Microcalorímetro diferencial de barrido MC-2D (MicroCal Inc., Northampton, M.A., USA).
- Microelectrodo de pH 6 mm (Crison Instruments, SA, E-08328 Alella, Barcelona, España).
- Ordenador PC compatible.
- Placas de anfolitos para isoelectroenfoque PAGplate pH 3.5-9.5 de poliacrilamida (T = 5%, C = 3%) con una concentración de anfolitos de 2,2% (p/v) (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia).
- pH-metro digital Crison micropH 2001 (Crison Instruments, SA, E-08328 Alella, Barcelona, España).

### 4.1.3. CRISTALOGRAFÍA DE PROTEÍNAS

- Cristalizador Honeybee931 (Genomic solutions Inc)
- Synchrotron Light Source Laboratory LNLS

## 4.2. REACTIVOS

### 4.2.1. PURIFICACIÓN

Polietilenglicol 10000 (PEG), sulfato amónico  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ , fosfatos tales como  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaCl}$  TRIS-HCl, todos ellos de gran pureza de Sigma (ST. Louis, MO, USA). Resinas: Fenil-Sefarosa CL-4B de Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Suecia) y TSKgel DEAE-5PW de Tosoh Corporation (Tokio, Japón). Kit de calibración de bajo pesos molecular (LMW) para una columna Superdex 200 10/30 HR (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia).

### 4.2.2. SUSTRATOS DE ACTIVIDAD PEROXIDASA

Guayacol (2-metoxifenol), ABTS (2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) sal diamónica, o-dianisina (3,3'-dimetoxi-4,4'-diaminobifenilo) y o-fenilendiamina, todos ellos de elevada pureza, proceden de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).

Generales: Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) de Merck (Damstadt, Alemania). Ácido clorhídrico (HCl), hidróxido sódico (NaOH), hidrocloreto de guanidina sólido (hidrocloreto de iminourea), hidrocloreto de guanidina (solución 8 M), carbonato de sodio y tampón HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-yl]-etanosulfónico) son de Sigma. Ácido bórico y ácido perclórico de Panreac (Barcelona, España).

#### **4.2.3. TÉCNICA DE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)**

TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina), APS (persulfato amónico), SDS (dodecilsulfato sódico), azul de Coomassie R-2500, ácido acético, glicina, glicerol y etanol son de Sigma. El  $\beta$ -mercaptoetanol es de Merck. El gel se hace con una solución comercial llamada Proteogel de alto grado de pureza (99%), con una composición acrilamida: bisacrilamida 37, 5:1 de Laboratorios Conda, S.A. Pronadisa (Torrejón de Ardoz, Madrid, España). El marcador de PM para SDS-PAGE Novex Sharp Pre-Stained de Invitrogen (Invitrogen Life Technologies Corporation, Van Allen Way, Carlsbad, California 92008, USA).

#### **4.2.4. MÉTODO LOWRY**

Albúmina de suero bovino (BSA) y carbonato sódico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) de Sigma. El sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), el tartrato sódico y el reactivo folin-ciocalteu de Panreac.

#### **4.2.5. TÉCNICAS CRISTALOGRÁFICAS**

Tampón MES y etilenglicol, de Sigma (St. Louis, MO, USA). Matrices de muestreo (Sparse Matriz) para encontrar las condiciones óptimas de cristalización de 24 pocillos: Cristal Screens I y Cristal Screens II (Hampton Research, 34 Journey, Aliso Viejo, CA 92656-3317, USA).

#### **4.2.6. TÉCNICA DE ISOELECTROENFOQUE**

Kit de calibración de pI 4,45-9,6 de Biorad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)

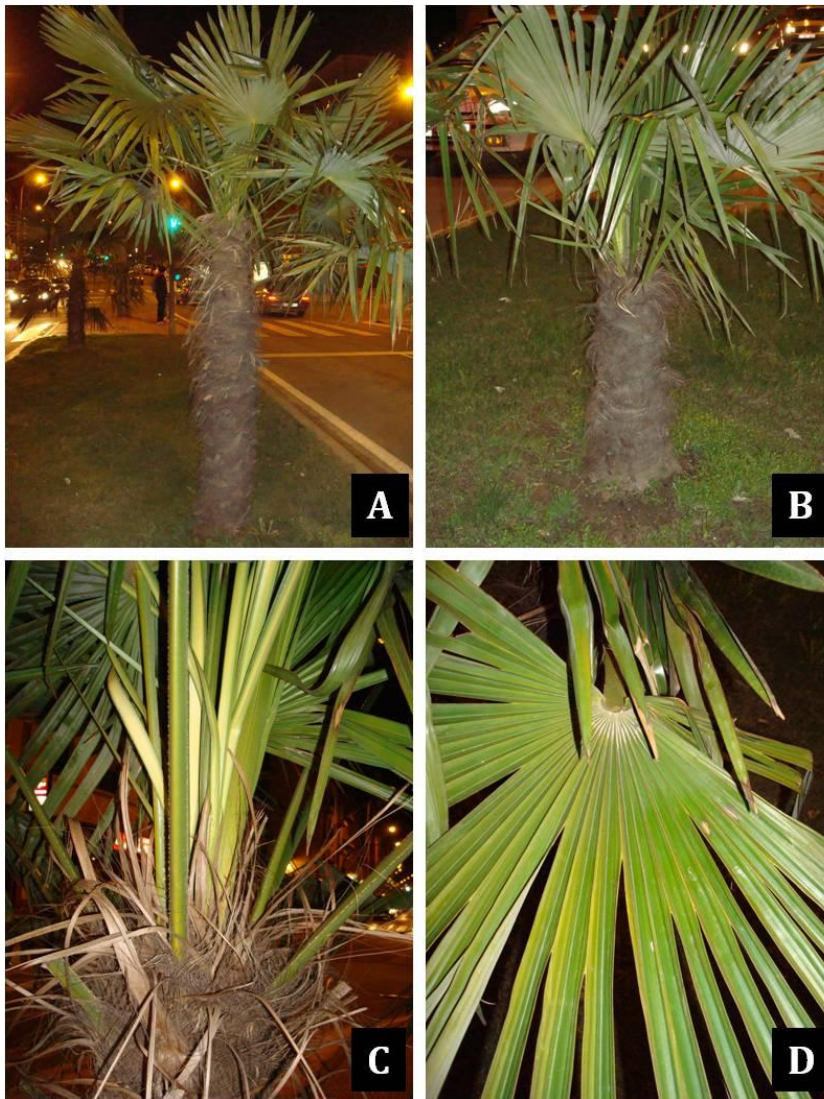
### 4.3. MATERIAL BIOLÓGICO

#### 4.3.1. PALMERA *Chamaerops excelsa*

La palmera *Chamaerops excelsa* es una especie de la familia de las *Arecaceae* originaria de la China central y oriental, pero plantada como planta ornamental en todas las zonas templadas, teniendo elevada presencia en los países mediterráneos por su buena resistencia al frío y a altas temperaturas.

Su tronco alcanza hasta 12 m de altura, y queda recubierto (total o solo la parte superior) por las vainas de las hojas caídas, lo que le da un aspecto “peludo”. Las hojas son palmadas, con un limbo de unos 50 cm de largo por 75 cm de ancho, con peciolos con los márgenes serrados y un poco más largos que el limbo.

Las hojas proceden de varios ejemplares de 6-7 años que se encuentran en la mediana de la Avenida Canalejas en la ciudad de Salamanca, pero se pueden encontrar ejemplares de esta misma especie en toda la comunidad autónoma con fin ornamental.



**Figura 4.1.** Palmera *Chamaerops excelsa*. A y B son las dos palmeras con las que se ha trabajado para la extracción de la peroxidasa. C. es el tallo y donde nacen las hojas. D. Hojas de *Chamaerops excelsa*.

## 4.4. MÉTODOS EXPERIMENTALES

### 4.4.1. PURIFICACIÓN DE PEROXIDASA DE PALMERA *Chamaerops excelsa*

El proceso de purificación de la palmera *Chamaerops excelsa* consta de las siguientes etapas (Esquema 4.1):

- Recolección y limpieza de las hojas.
- Homogeneización.
- Extracción de pigmentos mediante reparto bifásico.
- Fraccionamiento cromatográfico
  - Cromatografía hidrofóbica.
  - Cromatografía de intercambio iónico.
  - Cromatografía de filtración en gel o exclusión molecular.

#### 4.4.1.1. RECOLECCIÓN Y LIMPIEZA DE LAS HOJAS

El proceso de purificación comienza tras cortar las ramas de la palmera. En primer lugar, se eliminan todas las hojas de la rama, limpiándolas con un paño húmedo y retirando la vaina central que posee una consistencia altamente fibrosa, escasa en proteína, y que, además, dificultaría mucho el proceso de trituración. Las hojas se cortan en trozos de 2-3 cm de longitud (Figura 4.2A), se congelan en N<sub>2</sub> líquido (Figura 4.2B) y se trituran con un picador doméstico (Moulinex) (Figura 4.2C). El proceso es bastante eficaz, ya que las hojas se reducen casi en su totalidad a un polvo verde. Se pesa ese material, del cual se extraerá la proteína.

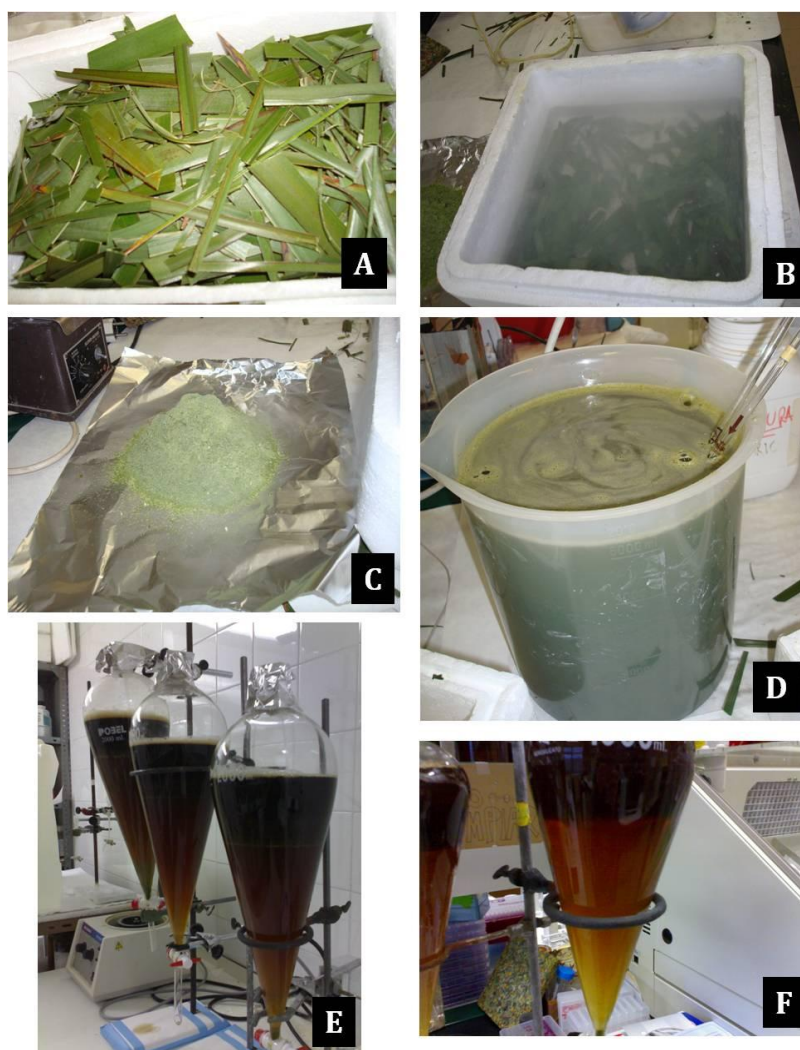
#### 4.4.1.2. HOMOGENEIZACIÓN

Se procederá a la extracción a 20 °C de las proteínas solubles, para lo cual se utiliza H<sub>2</sub>O destilada en relación 1:6 (m:v). Este proceso se lleva a cabo durante 22-24 h, sin agitación constante, tan solo se agita cada 1-2 h,



de modo manual. La proteína de interés es soluble en agua y por ello pasará a la fase acuosa durante este proceso (Figura 4.2D).

Posteriormente, se procede a la filtración a vacío, primero sin papel de filtro y después utilizando gasas estériles para retirar parte del sólido que es capaz de pasar a través de los poros del embudo Büchner, A partir de este material vegetal sólido, se hace una segunda extracción con 1/6 del volumen inicial de H<sub>2</sub>O y se filtra como se explicó anteriormente. Es muy eficaz, con ayuda de las gasas, extraer la fase acuosa, utilizando una técnica de estrujamiento de las gasas. Se hace una estimación del volumen de H<sub>2</sub>O que se pierde en el extracto crudo cuando se filtra a vacío, suponiendo una pérdida de aproximadamente un 4%. Una vez eliminado el material sólido, se centrifuga la fase acuosa para retirar lo que ha superado el proceso de filtración. Se usa la centrífuga a la velocidad de 1020 g, 4 °C, 15 min. Se centrifuga en fracciones de 50 mL, apareciendo un precipitado verde oscuro (pellet), de aspecto arcilloso, que se elimina fácilmente por decantación.



**Figura 4.2. Tres primeros pasos de la purificación.** A. Hojas limpias y cortadas. B. Congelación en  $N_2$  líquido. C. Polvo obtenido tras la trituración. D. Homogeneización en agua. E. Decantación inicial. F. Reparto bifásico final.

#### 4.4.1.3. EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS POR REPARTO BIFÁSICO

Se lleva a cabo para la eliminación de fenoles, polifenoles y productos de oxidación de estos compuestos mediante un método de reparto bifásico con polietilenglicol (PEG, 10000 wt) y sulfato amónico  $((NH_4)_2SO_4)$ .

Sobre el extracto de las hojas se adiciona un 14% (m:v) de PEG en fracciones de no más de 100 g y se agita a TA hasta su completa disolución, para ello se utiliza un agitador magnético. La agitación debe ser suave, sin que aparezca espuma sobre la superficie del extracto, para que no se lleve

a cabo la desnaturalización de la enzima. Cuando todo el PEG se ha solubilizado, se mide de nuevo el volumen y se adiciona  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 10% (m:v) en la misma proporción de fracciones que el reactivo anterior, con agitación suave hasta su completa disolución (Figura 4.2E).

Esta solución se deja en reposo en un embudo de decantación durante 8 h a 4 °C para la formación de las dos fases, cada una de las cuales posee aproximadamente el 50% del volumen inicial. La fase superior, de color oscuro, es donde se encuentran la mayor parte de los pigmentos, fenoles, polifenoles, productos de oxidación que aparecen durante el proceso, PEG y enzimas de naturaleza hidrofóbica. En la fase inferior, de color amarillento, es donde se encuentran las proteínas hidrosolubles, entre ellas, la peroxidasa (Figura 4.2F). Esta fase se centrifuga a 1020g y 4 °C, durante 15 min, en fracciones de 50 mL, debido a que la interfase de separación es muy lábil y durante el proceso de decantación se arrastra parte de la fase superior. La fase inferior debe tener la misma conductividad iónica que el tampón de equilibrado (fase móvil) de la siguiente etapa de cromatografía hidrofóbica ( $\sim 200 \text{ mS cm}^{-1}$ ). Como la conductividad es menor ( $\sim 150 \text{ mS cm}^{-1}$ ) se adiciona  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hasta alcanzar ese valor.

#### 4.4.1.4. FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO

Todos los tampones usados durante el fraccionamiento cromatográfico se han hecho con agua MiliQ, han sido filtrados con filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  y se han desgasificado por extracción a vacío.

##### 4.4.1.4.1. CROMATOGRAFÍA HIDROFÓBICA

Esta cromatografía se lleva a cabo a TA con un equipo de baja presión. Se utiliza una columna de vidrio de 50  $\text{cm}^3$  (1,4  $\text{cm}$  x 35  $\text{cm}$ ) que se empaqueta manualmente con 45  $\text{cm}^3$  de Fenil-Sefarosa CL-4B (Figura 4.3A). Este relleno contiene grupos fenilos covalentemente unidos a una matriz que contiene un 4% de agarosa, tiene un tamaño medio de partícula de 90  $\mu\text{m}$  y un rango de pH de trabajo comprendido entre 3 y 12. Ya que la serie de Hofmeister indica que un aumento del efecto salino incrementa las interacciones hidrofóbicas (Tabla 4.1), se equilibra el relleno con tampón fosfato 100 mM, pH 6,5, 1,7 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , a una velocidad de flujo de 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Cuando se satura se lava la columna con 4-5 volúmenes de tampón fosfato 100 mM, pH 6,5, 0,2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , a la misma velocidad de flujo, recogiénose fracciones de 15 mL, en las que se mide su actividad peroxidasa. Todas aquellas que poseen actividad peroxidasa se juntan y se dializan frente a 5 L de tampón TRIS-HCl 8.0 mM, pH 9,3, 4  $^\circ\text{C}$  durante 24 h, con agitación constante, realizando varios cambios de tampón. Proceso imprescindible para que funcione correctamente la cromatografía que le sigue, conllevando a un aumento de volumen del 30-40%. Por ello la muestra dializada se concentra sucesivas veces hasta la obtención de un volumen no más de 30 mL por centrifugación a 306  $g$ , 4  $^\circ\text{C}$ , durante 40 min, con centricones de 10 kDa y 12 mL que permiten el paso de las sales, agua y solutos de pequeño tamaño molecular a través de su membrana pero no de proteínas de elevada masa molecular.

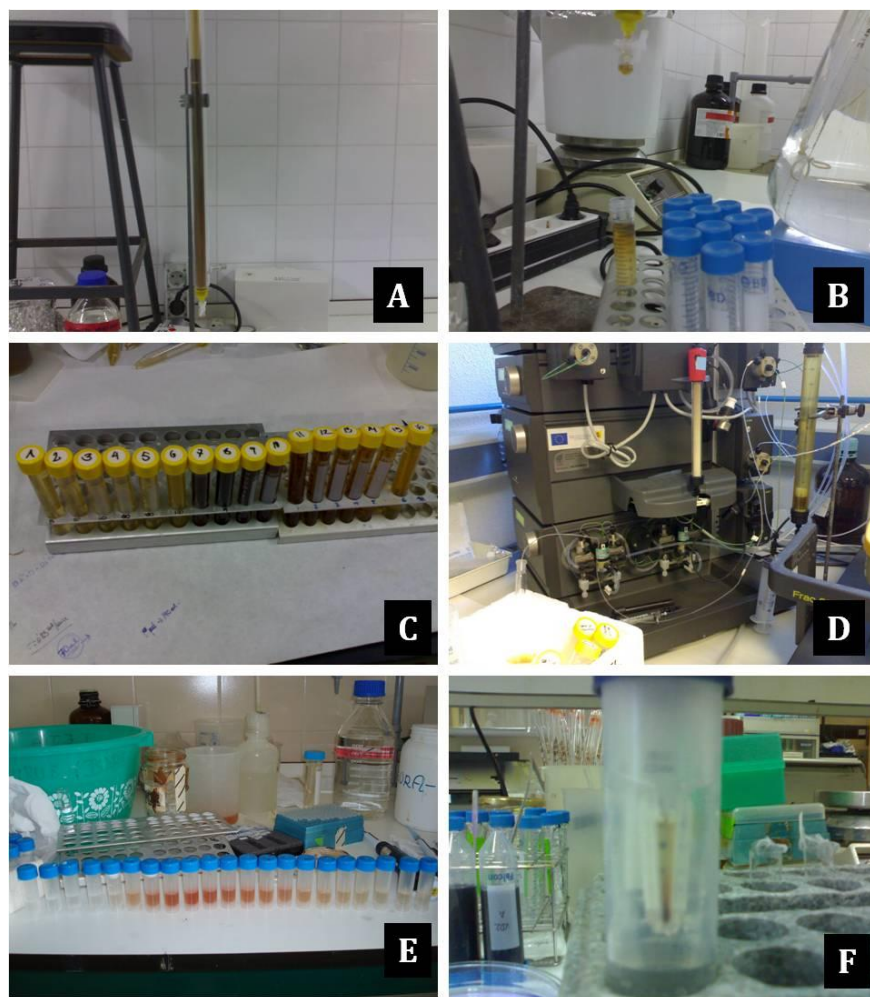
**Tabla 4.1. Serie de Hofmeister que indica los iones que favorecen los efectos salinos y caotrópicos.**

← Aumento del efecto salino										
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	Br <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	I <sup>-</sup>	SCN <sup>-</sup>		
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Rb <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Cs <sup>+</sup>	Li <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ba <sup>2+</sup>		
Aumento del efecto caotrópico →										

#### 4.4.1.4.2. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Esta cromatografía FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) se lleva a cabo a TA (Figura 4.3D). Se empaqueta manualmente una columna de vidrio (1 cm x 30 cm), con 12 cm<sup>3</sup> de fase de TSKgel DEAE-5PW (tamaño medio de partícula 20-30 μm y diámetro de poro 1000 Å), resina cargada positivamente con restos dietilaminoetil (5000-PW-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sup>+</sup>-(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>) a los que se unen las proteínas que estén cargadas negativamente. Se utiliza como tampón de equilibrado TRIS-HCl 5,0 mM, pH 9,3, a una velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. Como el volumen de muestra es grande, se inyectan volúmenes de 12,0 mL. La elución se lleva a cabo con tampón TRIS-HCl 5,0 mM, pH 9,3, 1 M de NaCl, con un gradiente lineal de 0-300 mM de NaCl y una velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> recogiéndose fracciones de 0,5 mL.

Todas las fracciones que forman parte del cromatograma se juntan antes de pasarlas por la siguiente columna cromatográfica, se concentran al máximo en centricones de 10 kDa, 12 mL, 306 g, 4 °C, 40 min (Figura 4.3F).

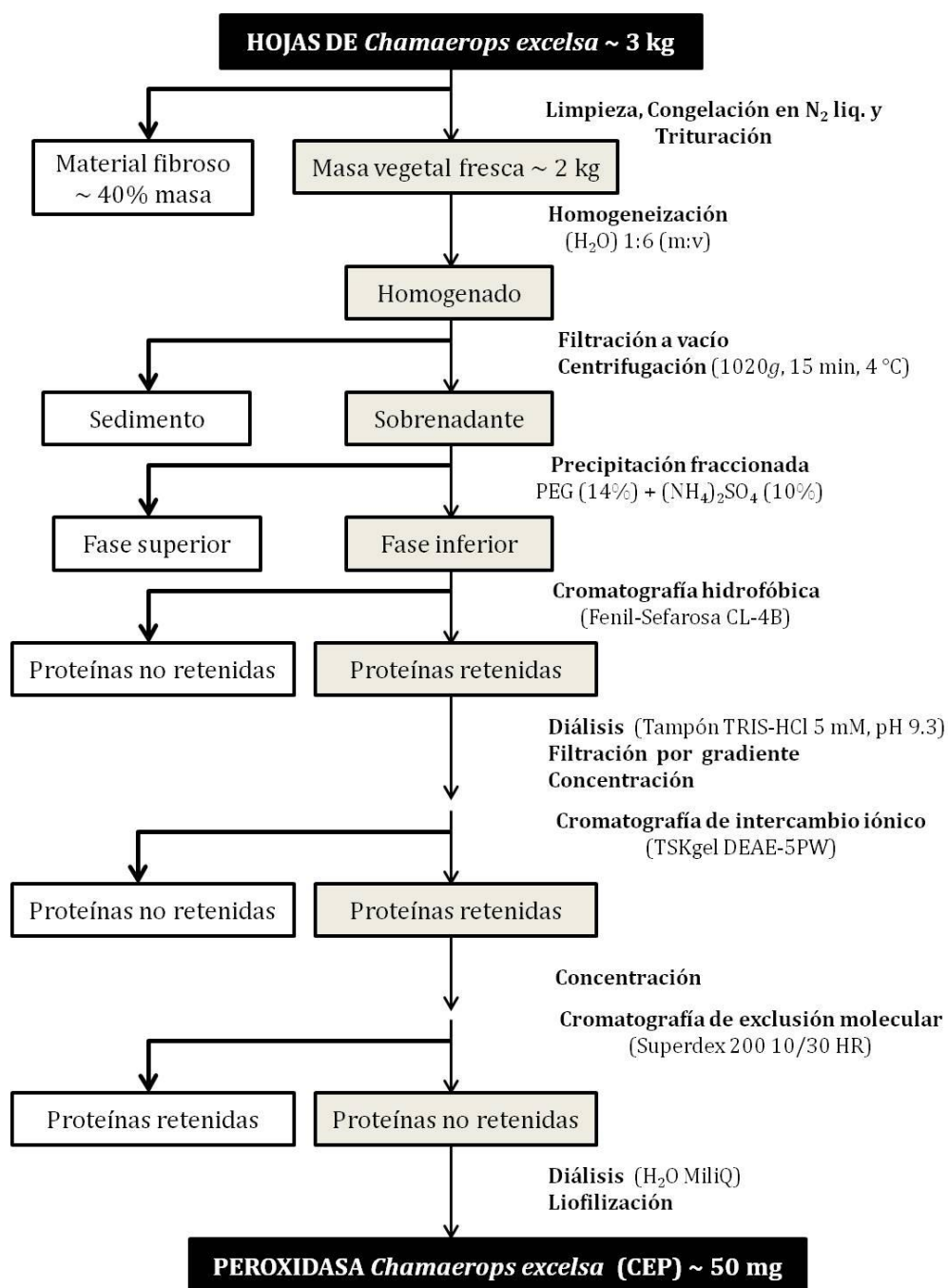


**Figura 4.3. Fraccionamiento cromatográfico.** A. Cromatografía hidrofóbica. B. Cromatografía hidrofóbica en el momento de salir la muestra. C. Fracciones recogidas en la cromatografía hidrofóbica (Se puede observar donde se encuentra la muestra debido a su color marrón intenso). D. ÄKTA para cromatografía de intercambio iónico. E. Fracciones recogidas en la cromatografía de intercambio iónico (se puede observar donde está la muestra por su color naranja intenso). F. Centricón conteniendo la muestra.

#### 4.4.1.4.3. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR O GEL-FILTRACIÓN

Esta cromatografía FPLC se lleva a cabo a TA. Se utiliza como fase estacionario Superdex 200 10/30 HR empaquetada comercialmente (matriz de agarosa y dextrano con un tamaño de poro de 13  $\mu\text{m}$ , rango de pH de trabajo entre 3 y 12, y rango de separación óptima entre 10 y 600 kDa). Se equilibra con tampón TRIS-HCl 5,0 mM, pH 9,3. La velocidad de flujo es de 0,5 mL  $\text{min}^{-1}$ .

La muestra obtenida de esta cromatografía se concentra empleando un centrífugo de 10 kDa en una centrífuga a 306 *g*, 4 °C, 40 min. Se pierde un 1% de actividad en el filtrado. El concentrado se dializa frente a agua MilliQ en cámara fría durante 24 h y finalmente se liofiliza. De este modo, se puede conservar durante años en cámara fría o a TA.



Esquema 4.1. Representación esquemática del proceso de purificación de la peroxidasa de palmera *Chamaerops excelsa* (CEP).

#### 4.4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMERA *Chamaerops excelsa*

##### 4.4.2.1. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad peroxidasa se puede medir utilizando una gran variedad de sustratos tales como: ABTS, guayacol, o-dianisidina y o-fenilendiamina. El ABTS y el guayacol son los sustratos más comúnmente utilizados ya que el ABTS es un cromógeno de uso común en el ensayo de inmunoabsorción ligado a peroxidasas (ELISA) y por otro lado el guayacol es un antihistamínico y uno de los cromógenos más utilizados para la medida de actividad de las peroxidasas. De este modo se podrán comparar unos resultados con otros. Los productos de oxidación de estos sustratos absorben en la región visible del espectro a diferentes longitudes de onda (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2. Características de los sustratos utilizados para medir la actividad peroxidasa.** Los datos de concentraciones óptimas son los correspondientes a la peroxidasa de palma real (Zamorano, 2009). Los parámetros indicados son la longitud de onda de medida ( $\lambda$ ), el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ), la concentración de sustrato reductor ( $[AH_2]$ ) y la concentración de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Todas las medidas fueron efectuadas a temperatura ambiente (20-25 °C) en un intervalo de tiempo de 2-3 minutos.

Sustrato	$\lambda$ (nm)	$\epsilon$ ( $M^{-1} cm^{-1}$ )	$[AH_2]$ (mM)	$[H_2O_2]$ (mM)
ABTS	414	31100	0,032	1,12
Guayacol	470	5200	18,0	4,9
o-Dianisidina	420	30000	0,2	4,2
o-Fenilendiamina	445	11100	1,5	2,8

La actividad peroxidasa se determina espectroscópicamente. Una alícuota de solución enzimática (1-20  $\mu$ L) se adiciona a 2 mL de tampón fosfato 20,0 mM, pH 6,0 que contiene 18,0 mM guayacol y 4,9 mM  $H_2O_2$  como sustratos. Los cambios de absorbancia debidos al producto de oxidación del guayacol se siguen a 470 nm durante 2 min y 25 °C.



Una unidad de actividad peroxidasa se define como la cantidad de enzima que oxida 1  $\mu\text{mol}$  de guayacol por minuto ( $\epsilon_{470} = 5200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La actividad específica se expresa como unidades de actividad por miligramo de proteína ( $\text{U mg}^{-1}$ ). La medida de actividad está directamente relacionada con la pendiente de la recta  $A_{470}$  (t). Los ajustes de regresión lineal poseen sus mejores coeficientes de correlación cuando los valores de absorbancia se encuentran entre 0 ( $t_0$ ) y 0,5-1,1 ( $t_f$ ).

En el cálculo de la actividad peroxidasa hay que tener en cuenta: el volumen de la alícuota de la enzima, el volumen de la mezcla de reacción, un factor de conversión para expresar el resultado en  $\text{U mL}^{-1}$  y un factor de dilución en caso de que sea necesario. Las actividades enzimáticas de las muestras se miden por triplicado. Los coeficientes de variación en las medidas suelen ser de  $\sim 7\%$ .

#### 4.4.2.2. ANÁLISIS DEL CONTENIDO PROTEICO EN SOLUCIÓN

Existen varios métodos para determinar la concentración de una proteína en solución (Stoscheck, 1990). Los más empleados son el método de Bradford y de Lowry, en los cuales se observan cambios en las propiedades colorimétricas de una sustancia (Bradford *et al.*, 1976; Lowry *et al.*, 1951). Estas metodologías implican realizar experimentos con tiempos de incubación determinados, curvas patrones, y consumo de la proteína, siguiéndose espectrofotométricamente en la zona visible.

Experimentalmente, en primer lugar, se construye una recta de calibrado a partir de una disolución madre de BSA  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $M = 66 \text{ kDa}$ ,  $\epsilon_{280} = 43824 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), con cantidades que oscilan entre 0 y  $150 \mu\text{g}$  ( $0\text{-}150 \mu\text{L}$ ) de la proteína BSA, para que la linealidad sea óptima. Una vez construida esta recta patrón, se determina el contenido proteico en las distintas muestras por triplicado. Cada muestra proteica se lleva a un volumen final de  $400 \mu\text{L}$  con agua MiliQ. Sobre este volumen se adicionan 2 mL de reactivo de cobre alcalino (1 mL de  $\text{CuSO}_4$  al 1% (m:v), 1 mL de tartrato sódico al 2% (m:v) y 98 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% (m:v) en 0,1 M

NaOH), se agita en el vortex y se incuba durante 10 min a 25 °C. Pasado este tiempo, sobre cada muestra se adicionan 100 µL del reactivo Folin-Ciocalteu, se agita en el vortex y se incuba durante 30 min. A continuación, se procede a la lectura de la absorbancia a 500 nm. Este proceso se hace primero para construir la recta patrón y luego con las muestras proteicas, por triplicado.

#### 4.4.2.3. ANÁLISIS DE LA PUREZA POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Cuando se purifica una proteína, se calcula el grado de pureza para estimar la eficacia del proceso de purificación. Además, si se quieren realizar estudios que requieren instrumentación biofísica, así como, calorimétricos y espectroscópicos, se requiere que las muestras de proteína tengan un grado de pureza lo más elevado posible.

La pureza de muestras biológicas y sus posibles contaminaciones se pueden determinar por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Fairbanks *et al.*, 1971). Como las peroxidasas monoméricas tiene una masa molecular que oscila entre 30 y 50 kDa, se trabajará con geles de poro intermedio (10-12%) que son útiles para separar proteínas entre 10 y 90 kDa. Al trabajar en condiciones desnaturizantes debido al uso del SDS, las proteínas se encuentran en forma de bastón, cargadas negativamente. La cantidad de SDS unido a la proteína es directamente proporcional a su tamaño, por ello, en el gel poroso las proteínas se van a separar en función de su peso molecular. Con esta técnica, se puede estimar la masa molecular (M) de la proteína en forma monomérica con un margen de error ~10%. A mayor movilidad electroforética, menor tamaño molecular. Si se tiene un kit de proteínas de masas moleculares conocidas y se mide su distancia de migración en el gel, se puede construir una recta de calibrado, representando la movilidad relativa ( $R_f = \text{distancia recorrida por la banda proteica (mm)}/\text{distancia recorrida por el colorante azul de bromofenol (mm)}$ ) de cada proteína frente al  $\log M$ ). De este modo, midiendo la movilidad relativa de la

proteína objeto de estudio e interpolando sobre la recta de calibrado, se puede determinar su masa molecular.

La técnica SDS-PAGE posee un alto poder de resolución, ya que se utiliza un sistema electroforético discontinuo, formado por dos geles de distinta porosidad y pH. El superior, llamado concentrador, compacta las muestras y el inferior, llamado separador, las separa (Tabla 4.3). Se trabaja con unas concentraciones finales de proteína  $\sim 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  y las disoluciones utilizadas para realizar este tipo de electroforesis son las siguientes:

- Proteogel: 30% acrilamida + 0,8% bisacrilamida
- Solución amortiguadora del gel concentrador (solución A): TRIS 0,25 M, pH 6,8.
- Solución amortiguadora del gel separador (solución B): TRIS 1,5 M, pH 8,8.
- Disolución de SDS al 10% (m:v).
- Disolución APS al 10% (m:v).
- Tampón de electroforesis: TRIS 25 mM, pH 8,3, glicina 250 mM y SDS 0,1% (m:v).
- Tampón de carga en condiciones reductoras: TRIS 20 mM, pH 8,0, glicerol 10% (v:v), AEDT 2 mM, azul de bromofenol 0,001% (m:v), SDS 0,2% (m:v) y  $\beta$ -mercaptoetanol al 4% (v:v).

**Tabla 4.3. Protocolo para la separación de los geles concentrador y separador**

Reactivos	Gel concentrador 4%	Gel separador 12%
Proteo-Gel	330 $\mu\text{L}$	1683 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O MiliQ	1500 $\mu\text{L}$	2500 $\mu\text{L}$
Solución A	630 $\mu\text{L}$	
Solución B		1250 $\mu\text{L}$
SDS 10%	33 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
TEMED	3 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
APS 10%	10 $\mu\text{L}$	15 $\mu\text{L}$

La tinción del gel se lleva a cabo en tres pasos:

- i. **Fijación:** con una disolución que contiene ácido acético al 10% (v:v) y etanol al 50% (v:v) en agua (Solución I). Se cubre el gel con 50-100 mL de Solución I, se calienta en el microondas hasta que hierve y se deja enfriar con agitación constante.
- ii. **Tinción:** Se preparan dos disoluciones, una de ácido acético al 7.5% (v:v) y etanol al 5% (v:v) en agua (Solución II) y otra de azul de Coomasie al 0,25% (m:v) en etanol (Solución III). Sobre 50-100 mL de la Solución II, se añaden 5-10 mL de la Solución III, cubriéndose con ello el gel. A continuación, se calienta en microondas hasta que hierve y se deja enfriar con agitación constante hasta que aparecen las bandas proteicas (10-20 min).
- iii. **Destinción:** Suele ser suficiente decolorar con agua destilada durante 1 noche. Si se desea una coloración más rápida, se puede lavar varias veces con una solución de ácido acético:etanol:agua (1:3:6 v:v:v).

Las condiciones eléctricas para llevar a cabo la electroforesis son: en el gel concentrador 100 V, en el gel separador 200 V.

#### 4.4.2.4. DETERMINACIÓN DE PUNTO ISOELÉCTRICO

La pureza de una muestra biológica o bien si una muestra enzimática pura contiene diferentes isoenzimas, se puede determinar mediante isoelectroenfoque (IEF). Esta técnica separa proteínas en función de su punto isoeléctrico (pI), es decir, pH al cual la carga neta de la proteína es nula), de modo que a su pI la proteína deja de moverse en el gel de los anfolitos sometido a la acción de un campo eléctrico uniforme.

Las condiciones de trabajo son las siguientes: 100 V (15 min) + 200 V (15 min) + 450 (40 min).

La tinción del gel se realiza mediante el kit de tinción de plata. La utilización de este mecanismo básico de tinción de geles con plata es relativamente sencilla de entender. La detección de la proteína depende de la unión de los iones de plata a las cadenas de aminoácidos, grupos primarios de sulfhidrilos y carboxílicos de proteínas (Switzer *et al.*, 1979; Oakley *et al.*, 1980; Merrill *et al.*, 1986), seguido de la reducción de metal libre de plata (Rabilloud, 1990; Rabilloud, 1999). Las bandas de proteínas se visualizan como puntos donde ocurre la reducción y como resultado, la imagen de la distribución de la proteína sin el gel se basa en la diferencia de potencial de oxidación-reducción entre el área del gel ocupado por proteínas y los sitios adyacentes libres. Un número de alteraciones en el procedimiento de tinción de plata puede originar un equilibrio de oxidación-reducción de modo que las proteínas del gel separadas serán visualizadas como bandas teñidas tanto positiva como negativamente (Merrill *et al.*, 1986).

La tinción del gel se llevará a cabo del siguiendo el protocolo siguiente:

- Fijación: 30 min en una solución de ácido acético al 5% y metanol al 50%.
- Lavado: 15 min en una solución de metanol al 50%.  
15 min en agua MilliQ.
- Sensibilización: 1 min en una solución de tiosulfato sódico al 0,01%.
- Lavado: 2 lavados de 1 min con agua MilliQ.
- Tinción: Nitrato de plata al 0,1% durante 20 min a 4 °C.
- Lavado: 2 lavados de 1 min con agua MilliQ.
- Revelado: Solución de carbonato sódico al 2% en formalina (formol al 35%) al 0,04%.
- Fijación: 5 min en una solución de ácido acético al 5%.
- Conservación: A 4 °C en ácido acético al 1%.

Todas las soluciones se prepararon en el momento de uso con agua MilliQ y con especial cuidado para evitar la contaminación con queratinas.

#### **4.4.2.5. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR / ESTADO DE AGREGACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR**

Este tipo de cromatografía se utiliza ampliamente en purificaciones bioquímicas, separando sustancias en función de su diferente tamaño molecular. Por tanto, mediante este método, las proteínas son fácilmente separables en iones o moléculas más pequeñas. Para llevar a cabo esta técnica se utilizan columnas que contienen diferentes tipos de fase estacionaria: dextranos con enlaces cruzados (Sephadex) agarosa (Sefarosa o Bio-gel A) o poli(acrilamida) (Bio-gel B). Todas estas matrices están constituidas de un material esponjoso hidratado que contiene poros de tamaño determinado. En función de las moléculas a separar se utilizarán unas u otras. En este caso, se determina la masa molecular de la proteína en estado nativo y por lo tanto la técnica, se usa también, para conocer el grado de agregación proteico.

Las partículas se separan en orden creciente de tamaño. Las más grandes, que no pueden penetrar en los poros del gel, se moverán a través del volumen muerto de la columna y saldrán las primeras. En cambio, las pequeñas, que pueden penetrar en los poros del gel, saldrán más tarde puesto que estas interacciones ralentizan su viaje a través de la columna, Cuanto menos sea una molécula, más retenida estará en los poros del gel y su volumen o tiempo de elución será mayor. Se puede relacionar el volumen de elución con la masa molecular, usando previamente un Kit de calibración que contenga proteínas con masas moleculares conocidas. Se pasarán individualmente por duplicado, cada una de las proteínas del Kit a través de la columna, midiendo el correspondiente volumen de elución. Con estos datos, se construirá una recta de calibrado. Finalmente pasaremos en las mismas condiciones la proteína de interés, e interpolando en la recta se podrá conocer su masa molecular.

Para llevar a cabo este estudio, se utiliza una columna de Superdex™ 200 10/300 GL, equilibrada con tampón fosfato 20 mM, 150 mM NaCl, pH 7,05. Se inyectan volúmenes de 100 µL a una velocidad de flujo de 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Se trabaja con un equipo ÄKTA<sub>FPLC</sub>. Como sistema de calibración se utiliza el Kit de gel-filtración de GEHealthcare LMW (Tabla 4.4).

**Tabla 4.4. Características de las proteínas del Kit de calibración de gel-filtración de GEHealthcare LMW.**

Proteína	M (Da)	Origen	Concentración (mg mL <sup>-1</sup> )
<b>Aprotinina</b>	6500	Hígado bovino	3
<b>Ribonucleasa A</b>	13500	Páncreas bovino	3
<b>Anhidrasa carbónica</b>	29000	Eritrocitos bovinos	3
<b>Ovoalbúmina</b>	43000	Huevo de gallina	4
<b>Conoalbúmina</b>	75000	Clara de huevo de pollo	3

La conoalbúmina, la ribonucleasa y la anhidrasa carbónica, pueden formar dímeros y oligómeros en pequeña proporción. Datos que se usarán para construir la recta de calibrado.

### 4.4.3. ESTABILIDAD DE LA PEROXIDASA DE PALMERA *Chamaerops excelsa*

#### 4.4.3.1. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

La calorimetría diferencial de barrido (DSC: *Differential Scanning Calorimetry*) es la técnica experimental más adecuada, fiable y reproducible para estudiar los cambios estructurales inducidos por el incremento de temperatura en proteínas (Privalov, 1974; Privalov y Potekhin, 1986; Freire, 1980; Shnyrov et al., 1997; Mandelman *et al.*, 1998), ácidos nucleicos (Privalov, 1978) y biomembranas (Mabrey y Sturtevant, 1978; Bach y Chapman, 1980). Es la técnica más adecuada para caracterizar termodinámicamente sistemas macromoleculares y realizar estudios de desnaturalización térmica de proteínas y de los factores que determinan su estabilidad (Privalov, 1979, 1982; Sánchez-Ruiz, 1995; Freire, 1995; Kurganov *et al.*, 1997; Zamorano *et al.*, 2008).

La DSC registra de manera continua la capacidad calorífica de una disolución de proteína u otra macromolécula biológica en función de la temperatura, obteniéndose un termograma. Este está caracterizado por una banda de absorción debido a una transición inducida térmicamente, por lo que, de acuerdo con el segundo principio de la Termodinámica, correspondería a un proceso endotérmico. El tratamiento de este parámetro permite caracterizar la transición termodinámica y, así determinar los parámetros como cambios entálpicos ( $\Delta H$ ), entrópicos ( $\Delta S$ ), de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) y en la capacidad calorífica ( $\Delta C_p$ ) asociados a la transición térmica y la función de partición, que permite averiguar la existencia de estados intermedios.

Las características comunes a todos los microcalorímetros diferenciales de barrido son:

- Medida de la diferencia de capacidad calorífica entre dos células lo más semejantes posibles (gemelas), una de referencia y otra de muestra.



- Barrido de temperatura continuo, lo cual es una desventaja, debido a la dificultad de la muestra a encontrarse en todo momento en equilibrio químico, con lo cual la velocidad de barrido utilizada no puede ser muy alta (2,0 °C min<sup>-1</sup>).
- Sistema adiabático, consiguiéndolo a través de un recubrimiento con dos corazas concéntricas, una interna y otra externa, de las células.
- Bloque calorimétrico fijo. Permite una mayor reproducibilidad de los datos experimentales.
- Sistema de presurización. Permite trabajar a temperaturas iguales o superiores a las de ebullición.
- Ausencia de agitación mecánica. Evita el calor producido por el efecto Joule, lo cual produciría una perturbación térmica.

#### 4.4.3.1.1. MICROCALORIMETRÍA DSC DE PROTEÍNAS

En la etapa inicial de su uso, el método DSC se aplicó por primera vez para estudiar proteínas pequeñas con transiciones térmicas reversibles. Este trabajo proporciona información fundamental sobre las propiedades termodinámicas de las moléculas proteicas: entalpías correctas y entropías del proceso térmico de desnaturalización, las contribuciones de varias interacciones moleculares de la estabilidad de las proteínas, las correlaciones entre la termodinámica y las características estructurales de las proteínas, los principios fundamentales de la energética de las proteínas y así sucesivamente.

Principales condiciones para la cantidad de capacidad calorífica absoluta de una proteína:

- Una depende solo de la estructura primaria de una proteína y contiene contribuciones de las frecuencias vibracionales que surgen de los modos

de tensión y flexión de cada banda de valencia y rotaciones internas (hasta 85%)

- Una que contiene las contribuciones de interacciones no covalentes que surgen de las estructuras secundarias y terciarias (sobre 3%); y
- Una que contiene las contribuciones de hidratación (15 a 40%).

El cambio en la capacidad calorífica en el desplegamiento es principalmente determinado por el aumento en el término de hidratación, aunque, en mucha menor medida, también por la pérdida de interacciones no covalentes (hasta 5%) (Shnyrov et al., 1997).

#### **4.4.3.1.2. ANÁLISIS DE LA DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA REVERSIBLE**

Cuando el proceso de desnaturalización transcurre en equilibrio, es necesario suponer un modelo, al que se puedan ajustar los perfiles calorimétricos y con el que se puedan determinar los distintos parámetros termodinámicos.

- **Modelo de equilibrio de dos estados**

En la desnaturalización térmica de muchas proteínas globulares pequeñas, se ha observado que existen únicamente dos estados significativamente poblados: el estado nativo (N), con la estructura plegada, y el estado desnaturalizado, con la estructura desplegada (D). Desde el punto de vista termodinámico-estadístico, estos estados N y D son en realidad dos macroestados formados cada uno de ellos por multitud de microestados que difieren muy poco en entalpía. El desplegamiento de estas proteínas se describe cuantitativamente mediante el modelo de equilibrio de dos estados, que se esquematiza de la siguiente forma:



Los dos estados N y D se encuentran en equilibrio en todo momento. La constante de equilibrio aparente de desplegamiento,  $K_D$ , viene dada por.

$$K_D = \frac{[D]}{[N]} \quad (4.2)$$

Y la fracción de proteína que se encuentra en estado D,  $x_D$ , será:

$$x_D = \frac{[D]}{[N] + [D]} = \frac{K_D}{1 + K_D} \quad (4.3)$$

Los valores termodinámicos, entalpía, entropía y energía libre de Gibbs, de este proceso se calcularán, respectivamente, del siguiente modo:

$$\Delta H_N^D = H(D) - H(N) \quad (4.4)$$

$$\Delta S_N^D = S(D) - S(N) \quad (4.5)$$

$$\Delta G_N^D = G(D) - G(N) \quad (4.6)$$

El exceso entálpico y el exceso de capacidad calorífica, son datos que se calculan teniendo en cuenta las ecuaciones de van't Hoff

$$\frac{\partial \ln K_D}{\partial T} = \frac{\partial H}{RT^2} \quad (4.7)$$

y Kirchoff

$$\frac{\partial \Delta H_D}{\partial T} = \Delta C_p \quad (4.8)$$

que definen la dependencia de la  $K_D$  y la entalpía del proceso con respecto a la temperatura, respectivamente.

$$\frac{\partial \Delta S_D}{\partial T} = \frac{\Delta C_p}{T} \quad (4.9)$$

$$\langle H \rangle = x_N H_N + x_D H_D \quad (4.10)$$

$$C_p = \frac{\partial \langle H \rangle}{\partial T} = x_D \Delta C_{Np}^D + \frac{K_D}{(1 + K_D)^2} \frac{(\Delta H_N^D)^2}{RT^2} \quad (4.11)$$

La temperatura de desnaturalización ( $T_{1/2}$ ) se define como la temperatura a la cual existe la misma cantidad de proteína en forma nativa que desnaturalizada, por lo tanto  $x_D = 1/2$ . En un proceso de desnaturalización de dos estados de una proteína monomérica, las transiciones predichas son prácticamente simétricas y el valor de  $T_{1/2}$  calculado está cerca de la temperatura correspondiente al máximo de capacidad calorífica ( $T_m$ ). El primer término de la última ecuación (8) representa la capacidad calorífica promedio de la proteína y se corresponde con la línea base química, mientras que el segundo se debe al cambio inducido por la temperatura en el equilibrio de desnaturalización. El área comprendida entre la transición y la línea base proporciona el cambio de entalpía total del proceso, y se conoce usualmente como entalpía calorimétrica. Cuando  $T = T_{1/2}$ ,  $x_D = 1/2$ , y por ello,  $K_D = 0$  y la energía de Gibbs de desnaturalización es cero. Por consiguiente, el cambio de entropía de desnaturalización a esa temperatura es:

$$\Delta S(T_{1/2}) = \frac{\Delta H(T_{1/2})}{T_{1/2}} \quad (4.12)$$

Del mismo modo, los valores de  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  y  $\Delta G$  a una temperatura  $T$ , se pueden calcular utilizando las ecuaciones termodinámicas habituales:

$$\Delta H(T) = \Delta H(T_0) + \Delta C_p(T - T_0) \quad (4.13)$$

$$\Delta S(T) = \Delta S(T_0) + \Delta C_p \ln\left(\frac{T}{T_0}\right) \quad (4.14)$$

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_0) + \Delta C_p(T - T_0) - T\Delta S(T_0) - T\Delta C_p \ln\left(\frac{T}{T_0}\right) \quad (4.15)$$

donde  $T_0$  representa una temperatura de referencia.

Todos estos parámetros son funciones de estado, es decir, sus valores sólo dependen de la naturaleza de los estados inicial (nativo) y final (desnaturalizado). Otro parámetro calculado normalmente es la entalpía de van't Hoff ( $\Delta H^{vH}$ ) o entalpía aparente, que se obtiene a partir de la forma (anchura) de la transición:

$$\Delta H^{vH} = 4RT^2 \left[ \frac{\Delta C_p^m}{\Delta H(T_m)} \right] \quad (4.16)$$

donde  $\Delta C_p^m$  es la variación de la capacidad calorífica a la temperatura  $T_m$ .

Si se supone que el proceso de desnaturalización se puede interpretar con el modelo de dos estados, se obtendrán valores para las entalpías calorimétricas y de van't Hoff muy similares, de modo que su relación  $\Delta H^{vH}/\Delta H_N^D$  será próxima a la unidad. Este hecho se cumple para un elevado número de proteínas globulares pequeñas, en las que la relación de entalpías tiene unos valores de  $r = 1,05 \pm 0,05$ , lo que indica una baja proporción de estados intermedios y, por lo tanto, una buena concordancia con el modelo de los estados (Privalov, 1979). Cuando  $r < 1$  existirán estados intermedios significativamente poblados y puede exigir agregación durante el proceso de desnaturalización, lo que suele ocurrir en el caso de las proteínas multiméricas. En estos casos, la  $T_m$  sí depende de la concentración de proteína utilizada (Sturtevant, 1987).

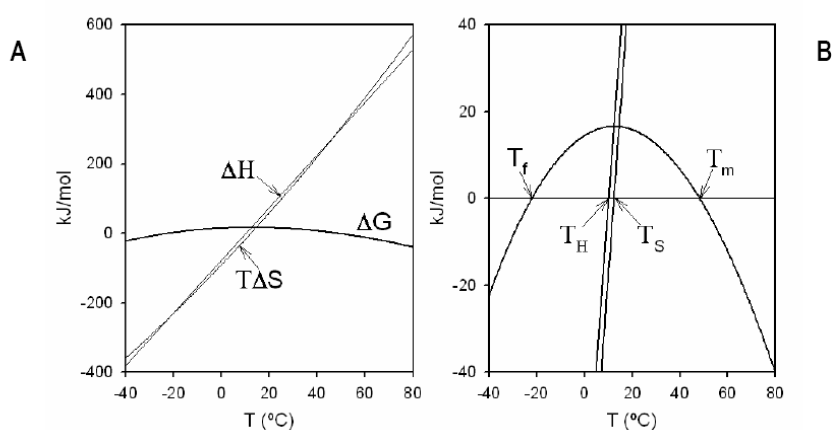
En la desnaturalización térmica de una proteína, la dependencia de  $\Delta G_D$  con la temperatura se denomina curva de estabilidad (Figura 4.4). Varios trabajos han destacado las propiedades más importantes de dicha curva (Becktel y Schellman, 1987; Schellman, 1987). Su pendiente viene dada por la expresión

$$-\frac{d\Delta G_D}{dT} = \Delta S_D \quad (4.17)$$

Y muestra un único máximo de temperatura  $T_S$  en la que  $\Delta S_D = 0$ . Además se define la temperatura  $T_H$  como la  $T$  a la cual la entalpía es nula ( $T_H$  es ligeramente menor que  $T_S$ ). Por otra parte, su curvatura viene dada por

$$\frac{d^2\Delta G_D}{dT^2} = -\frac{\Delta C_p}{T} \quad (4.18)$$

Y sólo adquiere valores negativos, dado que el  $\Delta C_p$  de desnaturalización es siempre positivo. El máximo de  $\Delta G_D$  se presenta a temperaturas bajas, ya que en esas condiciones está favorecido el estado nativo; este valor a 25 °C constituye una medida de la estabilidad de la proteína. El punto de corte con el cero a altas temperaturas se corresponde con la temperatura de desnaturalización,  $T_m$ . El punto de corte a bajas temperaturas,  $T_f$ , es el resultado de la extrapolación de la curva, por lo que podría esperarse que hubiera una desnaturalización proteica en frío. Este fenómeno fue predicho por Brants (1964) y se posteriormente Privalov (1986) lo demostró experimentalmente. La desnaturalización fría es una propiedad común de muchas proteínas globulares (Griko *et al.*, 1988; Tamura *et al.*, 1991; Azuaga *et al.*, 1992).



**Figura 4.4. A. Efecto de la  $T$  sobre  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  y  $\Delta G$  asociados al plegamiento proteico. B. Ampliación de la Figura 4.4A, que muestra las principales características de la curva de estabilidad (perfil de  $\Delta G$  frente a temperatura). Se señalan las temperaturas de desnaturalización caliente ( $T_m$ ) y fría ( $T_f$ ), así como las temperaturas de inversión de la entalpía y entropía.**

En la mayor parte del intervalo de temperatura de interés, los componentes entálpico y entrópico de  $\Delta G = (\Delta H, - T\Delta S)$  se cancelan casi totalmente, dando lugar a valores bajos de  $\Delta G$ . De hecho,  $\Delta G$  a 25 °C para proteínas globulares se encuentra normalmente entre 20 y 60 kJ mol<sup>-1</sup>.

#### 4.4.3.1.3. ANÁLISIS DE LA DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA IRREVERSIBLE

La desnaturalización térmica irreversible de proteínas es muy frecuente, como demuestra la ausencia de efectos térmicos en un barrido en el calentamiento de la muestra. La irreversibilidad de proteínas, generalmente se atribuye a alteraciones (autólisis, agregación, alteraciones químicas de residuos etc. (Klibanov *et al.*, 1987)) que bloquean a la proteína en un estado (el estado final: D') que es indeseable en el despliegue a la estructura nativa. Las alteraciones irreversibles son fundamentalmente procesos cinéticos que deben ser escritos por ecuaciones de velocidad. En el pasado, a menudo se asumía que las alteraciones irreversibles eran lentas y que ellas no tenían un lugar significativo durante el comparativo corto tiempo que la proteína pasaba en esa región; en realidad, la simulación teórica de los modelos de Lumry-Eyring (Lumry y Eyring, 1954) sugieren que en algunos casos, las transiciones DSC de calorimétricamente irreversible pueden ser susceptibles de un análisis de equilibrio termodinámico. Sin embargo, el trabajo experimental indica que las transiciones irreversibles DSC son a menudo muy distorsionadas por alteraciones proteicas irreversibles, como lo demuestran los efectos de la velocidad de barrido y la correlación entre el efecto térmico detectado por el DSC y el grado de desnaturalización medido por otros métodos. En realidad en muchos casos, datos de los experimentos se encuentran para la conformación de un modelo simple cinético en el cual solo los estados nativo (N) y desnaturalizado irreversible (D) son significativamente populares y el proceso de desnaturalización puede ser descrito completamente por una ecuación de primer orden:  $N \xrightarrow{k} D$  y  $d[N]/dt = -kt$ , donde el valor de la constante de primer orden ( $k$ ) depende de la temperatura y por lo tanto, a

tiempo para los experimentos DSC, los cuales implican un cambio en la temperatura con el tiempo de acuerdo a dar una velocidad de barrido.

▪ **Modelo simple de dos estados**

Es el modelo más simple que se conoce. La desnaturalización consiste en una transformación unimolecular de la proteína desde el estado nativo (N) al estado desnaturalizado (D), siguiendo una cinética de primer orden, con una constante de velocidad  $k$ :



Este modelo indica que la constante de velocidad es dependiente de la temperatura según la ecuación de Arrhenius

$$k = A \exp\left(-\frac{E_A}{RT}\right) = \left[\left(\frac{E_A}{R}\right)\left(\frac{1}{T^*} - \frac{1}{T}\right)\right] \quad (4.20)$$

donde  $A$  es el término pre-exponencial,  $E_A$  es la energía experimental de activación,  $T$  es la temperatura absoluta,  $T^*$  es la temperatura a la cual  $k = 1 \text{ min}^{-1}$ .

La ecuación de velocidad para este modelo es:

$$\frac{d[D]}{dT} = k[N] \quad (4.21)$$

Si la temperatura es un parámetro variable y su cambio en función del tiempo es constante ( $dT/dt \equiv v$ ,  $t$  es el tiempo), la ecuación adquiere la siguiente forma:



$$\frac{d[D]}{dT} = -\left(\frac{1}{v}\right)k[N] \quad (4.22)$$

La integración de esta ecuación permite calcular la proporción relativa del estado N,  $\gamma_N$ , como función de la temperatura ( $\gamma_N = [N]/[N]_0$ , donde  $[N]_0$  es la concentración de proteína en estado nativo a la temperatura inicial del experimento,  $T_0$ ):

$$\gamma_N = \exp\left\{-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \exp\left[\frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T^*} - \frac{1}{T}\right)\right] dT\right\} \quad (4.23)$$

Tomando el estado nativo como estado de referencia, se tiene que:

$$C_p^{ex} = \frac{d\langle\Delta H\rangle}{dT} = \frac{1}{v} \Delta H \exp\left\{\frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T^*} - \frac{1}{T}\right)\right\} \exp\left\{-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \exp\left[\frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T^*} - \frac{1}{T}\right)\right] dT\right\} \quad (4.24)$$

Asumiendo que  $\Delta H$  (entalpía de desnaturalización) es constante durante la transición, es decir, con perfiles obtenidos utilizando la línea base química (Kurganov *et al.*, 1997)

Estudios teóricos (Sánchez-Ruiz, 1992) muestran que este “*modelo irreversible de los dos estados*” es en realidad un caso límite del modelo más complejo de Lumry-Eyring. Esto es interesante ya que el método cinético ha sido empleado por Miles *et al.* (1995) en el análisis de curvas DSC correspondiente a la desnaturalización térmica irreversible de fibras de colágeno y posteriormente por este grupo de trabajo (Zamorano *et al.*, 2008) con peroxidasas de palmera real.

#### 4.4.3.1.4. EXPERIMENTO CALORIMÉTRICO

Para registrar las curvas de desnaturalización térmica de la CEP se ha utilizado un microcalorímetro diferencial de barrido de alta resolución MC-2 (MicroCal Inc., Northampton, MA, USA), que posee dos células de disco circular constituidas por una aleación de tantalio y niobio de 1,22 mL de volumen. Se trabaja con una sobrepresión de 2 atm, en un intervalo de temperatura comprendido entre 0 y 110 °C, con una velocidad de barrido que oscila entre 0,5 y 1,5 °C, con unas concentraciones proteicas comprendidas entre 0,1 y 4,0 mg mL<sup>-1</sup>.

La muestra suele ser una solución más o menos diluida de proteína (con un elevado grado de pureza ~ 2.8 y conocimiento de la concentración con exactitud), mientras que la referencia es únicamente una solución amortiguadora en la que está disuelta la proteína. Las muestras y soluciones amortiguadoras de trabajo (previamente filtradas y desgasificadas) deben inyectarse con sumo cuidado para evitar la formación de burbujas de aire, las cuales pueden interferir en la determinación de los datos experimentales. En primer lugar, hay que realizar un lavado de las células del calorímetro con agua MiliQ o utilizando una mezcla 1:10 (v:v) ácido fórmico:agua, seguido de un lavado intensivo con agua miliQ. Después se llenan las dos células con la disolución tampón y se registra la línea base instrumental. En realidad las dos células del calorímetro no son exactamente iguales y, por ello, es importante registrar la línea base que representará la señal introducida por esa asimetría y por otros factores instrumentales, ella será la referencia que permitirá eliminar del termograma la contribución instrumental. Se registran varios barridos de la línea base con los mismos parámetros (temperatura inicial y final del barrido, velocidad del barrido y tiempo de equilibrado final de un barrido e inicio del siguiente) hasta que su reproducibilidad esté dentro del rango de las especificaciones del instrumento.

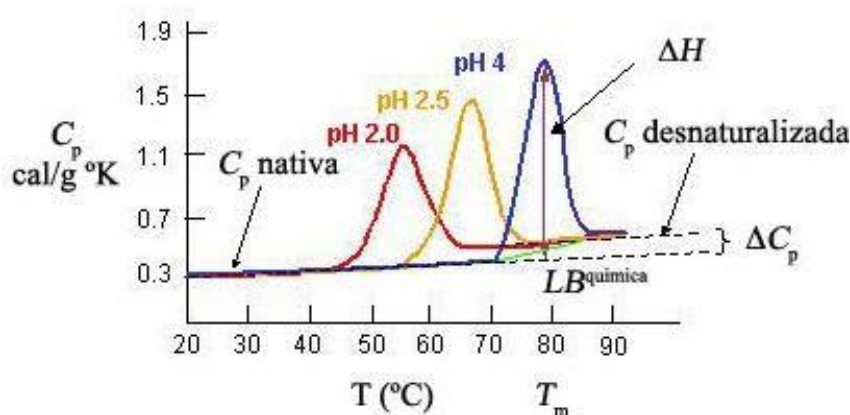
Una vez adquirida la línea base, se llena una célula de tampón (célula de referencia) y otra de disolución proteica (célula de muestra), y se registra el termograma. Este suele ser una curva con un pico endotérmico, que se debe a la absorción de calor asociado a la desnaturalización de la biomacromolécula inducida por la temperatura. Las dos células se calientan simultáneamente y a velocidad constante.

El instrumento detecta la diferencia de energía necesaria para mantener las dos células a la misma temperatura. Así, cuando aparecen diferencias en los procesos físico-químicos existentes en el interior de la célula (como la desnaturalización de la biomacromolécula), se observa una señal proporcional a esos cambios. Esto se consigue midiendo continuamente la potencia eléctrica necesaria para mantener la diferencia de temperatura entre las dos células igual a cero, a lo largo del barrido ( $\Delta T = 0$ ). Los cambios de potencia eléctrica detectados ( $\mu\text{W} = \mu\text{cal s}^{-1}$ ) son, tras haber sido normalizados en función de la velocidad de barrido, transformados en diferencia de capacidad calorífica entre las dos células ( $\text{kcal K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ). Los valores de capacidad calorífica en la zona pre- y post-transicional corresponden a las capacidades caloríficas de la biomacromolécula en estado nativo y desnaturalizado, respectivamente. Normalmente el termograma de la muestra aparece por debajo de la línea base, debido a que la capacidad calorífica de la macromolécula biológica es menor que la del agua que se desplaza (Privalov, 1979; Sturtevant, 1987, Sánchez-Ruiz, 1995). A partir del termograma resultante, tras sustraer la línea base, se pueden obtener algunos parámetros termodinámicos significativos de la transición calorimétrica (Figura 4.5)

Una vez realizado el primer barrido con la proteína, se registra otro sin extraer la muestra de la célula. Este segundo barrido permite conocer el grado de reversibilidad del proceso responsable de la transición calorimétrica observada, grado que se suele expresar en función del porcentaje del área bajo la curva que se recupera en el segundo barrido. Esto es importante para el análisis posterior, ya que, si la transición es reversible, se analiza un análisis termodinámico considerando que existe

un equilibrio químico entre los estados de la proteína significativamente poblados. En cambio si la transición es irreversible, no se podrá abordar este proceso desde la termodinámica de equilibrio sino que estos sistemas se tratarán desde un punto de vista cinético.

Una vez finalizado cada experimento, se lavarán las dos células exhaustivamente con agua MiliQ, para evitar los depósitos proteicos sobre las paredes.



**Figura 4.5. Parámetros termodinámicos que se pueden obtener directamente de un termograma (Privalov y Khechinashvili, 1974).**  $C_p^{\text{desnat}}(T)$ : capacidad calorífica de la biomacromolécula en estado desnaturalizado,  $C_p^{\text{nativo}}(T)$ : capacidad calorífica de la biomacromolécula en estado nativo,  $LB^{\text{química}}$ : capacidad calorífica intrínseca  $\Delta C_p$ : variación de capacidad calorífica entre los dos estados de la macromolécula biológica,  $\Delta H$ : entalpía calorimétrica y  $T_m$ : temperatura a la aparece el máximo de la curva.

#### 4.4.3.2. FLUORESCENCIA DE PROTEÍNAS

La fluorescencia es un proceso de emisión de radiación en la cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso energético en forma de fotones. Una de las características más atractivas de los métodos de fluorescencia es su sensibilidad inherente, la cual es, con frecuencia, de uno a tres órdenes de magnitud mayor que la de la espectroscopia electrónica de absorción. No

obstante, los métodos de fluorescencia se aplican mucho menos que los métodos de absorción debido al número relativamente limitado de sistemas químicos que tienen propiedades fluorescentes.

El tiempo de vida media de una especie excitada es breve, ya que existen diversas formas por las que una molécula excitada libera el exceso energético, relajándose y volviendo al estado fundamental. Estas formas pueden ser no radiantes como la relajación vibracional (colisiones entre las moléculas excitadas y moléculas de disolvente) o la conversión interna (relajación entre el nivel vibracional superior de otro estado electrónico). También existen formas de relajación radiantes como la fluorescencia. El camino más probable hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida media del estado excitado.

#### **4.4.3.2.1. ESTRATEGIAS GENERALES DE FLUORESCENCIA EN EL ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS.**

El método de fluorescencia intrínseca de proteínas puede ser usado con varios propósitos:

- Puede proporcionar información estructural sobre las proteínas, aunque esta información es local, ya que reflejan la estructura y propiedades del entorno inmediato de los cromóforos de las proteínas.
- Realizando cambios en la fluorescencia inducida por diversos efectores, se pueden sacar conclusiones sobre el carácter de los cambios estructurales causados por estos.
- Algunos parámetros fluorescentes se pueden usar para determinar varias características físicas y físico-químicas de las proteínas (dinámica e interacciones moleculares de las especies).

En el primero de los casos, el número de cromóforos en las proteínas no debe ser demasiado grande para facilitar la interpretación de los resultados experimentales.

Cabe señalar, que la fluorescencia intrínseca de proteínas puede estar lejos de la sensibilidad a todos los sucesos en una proteína. Pueden darse situaciones cuando los residuos de aminoácidos aromáticos, los cuales proporcionan información luminiscente, que estén localizados en regiones en donde la estructura y movilidad de la cual no estén afectados por incidentes en otras partes de las proteínas.

Para comenzar con el estudio de una nueva proteína por el método de fluorescencia, se debe elucidar su estabilidad a la acciones de tales factores como la temperatura, el pH y la fuerza iónica y encontrar posibles cambios estructurales en la temperatura, pH y fuerza iónica inducida. En ausencia de dicha información nos podríamos encontrar en una situación en la que todas las demás medidas se llevarán a cabo en los valores de los parámetros indicados de tal manera que la proteína está pasando de un lugar a otro, es decir, en una mezcla de diferentes estados proteicos. Esto podría complicar y enredar la interpretación de los datos experimentales obtenidos.

Después de obtener información como los efectos de la temperatura, pH y fuerza iónica sobre los parámetros de fluorescencia de la proteína, uno puede empezar a estudiar efectos sobre varios factores específicos sobre la estructura de la proteína. Estos pueden ser varios iones metálicos, alta o baja masa molecular, compuestos activos biológicamente, otras proteínas etc. La elección de los factores depende de la información disponible sobre las funciones de la proteína dada. Si la fluorescencia de la proteína es sensible a estos factores, se puede intentar medidas de parámetros de interacciones con la proteína.

A veces con el fin de obtener información sobre la estructura de la proteína, es útil, para estudiar su estabilidad frente a la acción de diversos desnaturalizantes, como por ejemplo la urea o el clorohidrato de guanidina, y de disolventes tales como alcoholes y dioxano.

Cabe señalar que a fin de obtener información cuantitativa sobre los parámetros de cambios de conformación de una proteína o para medir los parámetros de sus interacciones con otros compuestos, se debe usar

parámetros sobre la fluorescencia, que se relacionan linealmente con la fracción de conversión de un estado a otro. Por otra parte, se debe ser capaz de detectar los posibles estados intermedios de la proteína en el curso de su transición de un estado a otro (Permyakov, 1993).

#### 4.4.3.2.2. FLUORESCENCIA INTRÍNSECA DE LAS PROTEÍNAS

Las sondas fluorescentes intrínsecas de las proteínas son los aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr y Phe). Es posible que los cambios en algunas proteínas no estén localizados en los dominios que se encuentran estos aminoácidos, en cuyo caso la técnica no sería útil. Cuando una proteína contiene Trp, la contribución del resto de los aminoácidos al espectro de emisión de fluorescencia es pequeña, ya que la contribución del resto de aminoácidos al espectro de emisión de fluorescencia es pequeña, ya que la Tyr y la Phe tienen rendimientos cuánticos ( $q_F$ ) muy inferiores a los del Trp (Tabla 4.5). El mayor rendimiento cuántico del Trp respecto a la Tyr, unido a su mayor coeficiente de extinción y al hecho de que las tirosinas son adecuadas para transmitir por resonancia su excitación a los triptófanos, determina que los fluoróforos, por excelencia, de las proteínas, sean triptófanos y que estos residuos dominen sus espectros de emisión. Sólo las proteínas que carezcan de triptófanos y contengan tirosinas tendrán un espectro de emisión típico de la tirosina. La posición del máximo de emisión de fluorescencia de las proteínas que contienen Trp puede variar desde 307 nm (azurina) hasta 353 nm (glucagón), valores que dependen del grado de exposición del Trp al disolvente, siendo mayor la longitud de onda a mayor exposición (Tabla 4.5). Dependiendo de la longitud de onda de excitación, los aminoácidos aromáticos contribuirán más o menos al espectro de emisión de fluorescencia. Así, si se excita a 280 nm, sólo habrá emisión de fluorescencia por parte del Trp y de la Tyr, en cambio, si se excita a longitudes de onda superiores a 295 nm, solo habrá emisión de fluorescencia por parte del Trp.

Tabla 4.5. Parámetros de absorción y fluorescencia de los residuos aminoácidos aromáticos.

Residuo aminoácido	Absorbancia		Fluorescencia		Sensibilidad
	$\lambda_{\max}$ (Excitación)	$\epsilon_{\max}$ ( $M^{-1} cm^{-1}$ )	$\lambda_{\max}$ (Emisión)	$\Phi_F$	$\epsilon_{\max} \Phi_F$
Trp	280	5600	348	0,2	1100
Tyr	274	1400	303	0,14	200
Phe	257	200	282	0,04	8

La desnaturalización de proteínas genera un espectro de emisión de fluorescencia que puede tener mayor o menor intensidad que el de la proteína en estado nativo, pero la longitud de onda del máximo de emisión evoluciona siempre de forma previsible aumentando su valor. De este modo, el espectro nos proporciona información de los cambios en el entorno de fluoróforo. En algunas ocasiones existe una atenuación de la fluorescencia por parte de otras especies “quenching”. Este proceso es un retorno no radiante por contacto con una segunda molécula (metales pesados, acrilamida, I<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, O<sub>2</sub>, etc), que proporcionan información útil sobre la localización de los grupos fluorescentes en la estructura de una proteína. Este fenómeno depende de la accesibilidad que tenga el fluoróforo al “quencher”.

Las peroxidasas son enzimas que tienen como grupo prostético un grupo hemo que actúa como “quencher”, en la proteína en estado nativo. Sin embargo, cuando la proteína se encuentra en estado desnaturalizado, la intensidad de fluorescencia sufre un aumento significativo, causado por la reorientación del Trp con respecto al grupo hemo, que al alejarse de él ya no puede transferirle parte de su energía (Tsong, 1974; Brunet *et al.*, 1983; Hill *et al.*, 1986).

#### 4.4.3.2.3. EXPERIMENTO DE FLUORESCENCIA

Los espectros de emisión de fluorescencia se registran con un espectrofluorímetro Hitachi F-4010 (Hitachi Co., Ltd. Tokio, Japón). Se fija como longitud de onda 296 nm y se registran los espectros de emisión entre 300-400 nm, con una velocidad de barrido de 240 nm min<sup>-1</sup> y una anchura fija de rendija entre los monocromadores de excitación y emisión



de 5 nm. Se trabaja con soluciones proteicas que tienen una absorbancia a 280 nm inferior a 0,2. Los parámetros que se registran son la intensidad máxima de fluorescencia ( $I_{\max}$ ) y la longitud de onda del máximo de fluorescencia ( $\lambda_{\max}$ ) en función de la temperatura, controlada entre 20-85 °C, con la ayuda de un baño termostático que hace circular el agua alrededor del portacubetas, utilizando una velocidad de calentamiento de 1,8 K min<sup>-1</sup>. Además la temperatura se controla por inmersión de una sonda de temperatura en la celda de muestra a medida que ocurre la desnaturalización térmica. Se trabaja con una solución proteica de concentración 10 μM en tampón universal 10 mM, pH 7,0.

Los datos obtenidos experimentalmente se transforman en fracción de proteína desnaturalizada utilizando un ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados según indica la siguiente ecuación:

$$F_d = \frac{(y - y_N)}{(y_D - y_N)} \quad (4.25)$$

donde  $y_N = a_1 + a_2x$  e  $y_U = b_1 + b_2x$  representan respectivamente los valores medios de los parámetros de la proteína nativa y desnaturalizada, parámetros obtenidos por regresión de las líneas bases pre- y post-transición siendo el  $x$  el parámetro variable (en este caso  $I_F$  a 360 nm).

Cuando la desnaturalización térmica indica una transición irreversible cooperativa hacia el estado desnaturalizado (perfil sigmoideo), se pueden analizar esos datos usando un ajuste de regresión no lineal:

$$F_d = 1 - \exp \left\{ -\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \exp \left[ \frac{E_A}{R} \left( \frac{1}{T^*} - \frac{1}{T} \right) \right] dT \right\} \quad (4.26)$$

donde  $F_d$  es la fracción de proteína desnaturalizada. Con este ajuste de regresión, se puede llegar a determinar los valores  $T^*$  y  $E_A$  del proceso de desnaturalización.

#### 4.4.3.3. DICROÍSMO CIRCULAR

El dicroísmo circular (CD) es una técnica de espectroscopia de absorción electrónica basada en el cambio de la configuración electrónica molecular de un estado fundamental a un estado excitado, debido a la absorción de radiación electromagnética polarizada.

Cuando la luz quiral, circula polarizada, atraviesa una muestra ópticamente activa (molécula con un centro de asimetría), sus componentes de luz absorben en distinta magnitud a derecha que a izquierda ( $\epsilon_D \neq \epsilon_I$ ), lo que genera una luz elípticamente polarizada. Por ello, los espectros de DC miden la elipticidad molar  $[\theta]$  frente a la longitud de onda (Ku wajima, 1995).

El cromóforo más importante presente en las proteínas en el UV-lejano (180-250 nm) es el grupo amida del enlace peptídico, ya que posee un  $C\alpha$  asimétrico entre dos grupos amida. Por ello, esta técnica es muy sensible a los cambios de estructura secundaria. En el UV-cercano (250-340 nm), se reflejan contribuciones de cadenas laterales, puentes disulfuro, aminoácidos aromáticos y grupos prostéticos. Las estructuras secundarias formadas por los enlaces peptídicos son asimétricas y tienen espectros CD característicos (Tabla 4.6)

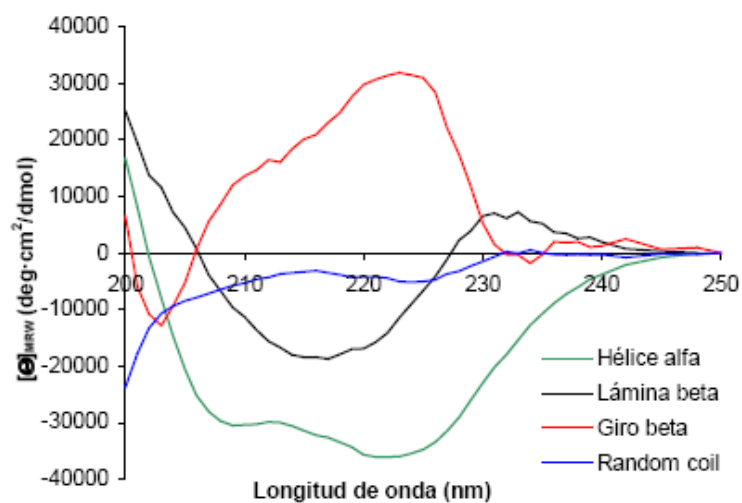
**Tabla 4.6. Máximos y mínimos que aparecen en los espectros CD de las proteínas en función de su estructura secundaria.** En la estructura mixta ( $\alpha+\beta$ ) predominan las bandas de  $\alpha$ -hélice sobre las de  $\beta$ -lámina. A veces, puede aparecer un hombro entre 210-220 nm, por el solapamiento de estructuras.

Estructura secundaria	Bandas + (nm)	Bandas - (nm)
Todo $\alpha$	191-193	222 y 201-210
Todo $\beta$	190-200	215-218
Mixta ( $\alpha+\beta$ )	190-195	222 y 208-210
Giro desordenado	212	195
Proteína desnaturalizada	220-230	200

#### 4.4.3.3.1. APLICACIÓN DE CD A PROTEÍNAS

La CD es una técnica muy utilizada para el estudio conformacional de las proteínas. En las últimas tres décadas, varios métodos se han desarrollado para el análisis de espectros CD de proteínas, basados principalmente, en las características espectrales de las estructuras secundarias de las proteínas (Greenfield y Fasman, 1969; Chen y Yang, 1971; Manavalan y Johnson, 1987; 1994a; Sreerama *et al.*, 1999). El DC aplicado a péptidos y proteínas permite estimar el contenido de las diferentes estructuras secundarias canónicas (hélice  $\alpha$ , lámina  $\beta$  paralela, al azar, etc.) que presenta en disolución (Kakanishi *et al.*, 1994), y para determinar si algún tratamiento ( $T$ , pH o agentes químicos) alteró su estructura terciaria (no se pueden determinar, pero se pueden observar las modificaciones) (Venyaminov y Vassilenco, 1994; Yang *et al.*, 1996).

La estimación se realiza a partir de la deconvolución del espectro de nuestra proteína problema como suma de varios espectros canónicos y en este proceso se utilizan programas (Sreerama y Woody, 1993) que, a partir de los espectros de CD de las estructuras canónicas o bien una serie de proteínas, permite calcular la contribución específica de las estructuras básicas en la proteína incógnita (el espectro observado es la suma de las diferentes estructuras básicas multiplicadas por una constante). Estos programas, utilizan estructuras predeterminadas similares a las mostradas en la Figura 4.6. para realizar sus cálculos.



**Figura 4.6. Espectros canónicos de dicroísmo circular de cuatro conformaciones básicas (Yang et al., 1986).**  $[\theta]_{\text{MRW}}$  indica elipticidad media por residuo (mean residue weight, MRW)

#### 4.4.3.3.2. EXPERIMENTO DE CD

Para realizar espectros CD en la región del UV-lejano hay que seleccionar con sumo cuidado las disoluciones amortiguadoras, las sales y otros aditivos que pueden absorber en este intervalo de longitudes de onda. El mejor tampón es fosfato 10 mM, si bien TRIS-HCl, perclorato y borato a bajas concentraciones, también se puede utilizar. Para modificar la fuerza iónica se recomienda utilizar KF en vez de NaCl, ya que el ión cloruro absorbe en el UV-lejano.

Los espectros se registran con un espectropolarímetro Jasco-715 (JASCO Inc., Easton, MD, USA) en el UV-lejano (190-250 nm). Se trabaja con un paso de banda de 2 nm, con células de 1 mm de paso óptico y concentraciones de proteína que oscilan entre 0,1-0,2 mg mL<sup>-1</sup>. Cada espectro es el promedio de cuatro, los cuales se registran con una velocidad de barrido de 50 nm min<sup>-1</sup> y se corrigen restándoles la línea base (espectro de la disolución amortiguadora), convirtiéndose las señales en valores de elipticidad molar.

Se registra el espectro de CD a 25 °C de la proteína nativa y de la desnaturalizada a pH 3,0 en tampón HEPES 20,0 mM, siguiéndose el

cambio en el valor de la elipticidad molar a 222 nm con respecto a la temperatura. Para llevar a cabo el calentamiento entre 30-80 °C, se ha usado un baño termorregulable, a una velocidad de calentamiento de 1K min<sup>-1</sup>.

La curva de desnaturalización se transformó en fracción de proteína desnaturalizada por ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados.

Cuando la desnaturalización térmica indica una transición irreversible cooperativa hacia el estado desnaturalizado (perfil sigmoideo), se pueden analizar esos datos usando un ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados. Con este ajuste se pueden determinar los valores de  $T^*$  y  $E_A$  del proceso de desnaturalización.

La determinación de la estructura secundaria de una proteína por análisis de los espectros de CD tiene diferentes grados de exactitud en función de la estructura que se está determinando. Si la estructura es de  $\alpha$ -hélice (97% de exactitud), lámina  $\beta$  (75%), giros (50%) y en caso de tener otro tipo de estructura (89%) (Manavalan y Johnson, 1987). Para determinar la estructura de la proteína a partir de su espectro CD, se utilizan bases de datos de espectro CD de proteínas de referencia, compuestas de elementos de estructura secundaria conocida. Se combinan resultados procedentes de varios programas que utilizan varias funciones matemáticas para construir el grupo de proteínas de referencia (Johnson, 1990; Greenfield, 1996). Los programas usados son SELCON3 (Sreerama y Woody, 2000), CDSSRT (Johnson, 1999) y CONTINLL (Provencher y Glockner, 1981; van Stokkum *et al.*, 1990). Como conjuntos de referencia se utilizan los modelos: SP43 (para proteínas intactas) y SDP48 (para proteínas desnaturalizadas). Dos factores son claves a la hora de analizar la estructura secundaria de una proteína: el rango de longitud de onda en el que se registre el espectro, debe encontrarse entre 180 y 260 nm y la determinación con una exactitud superior al 90% de la concentración proteica.

La espectroscopia de dicroísmo circular permite determinar la estructura terciaria de proteínas globulares. El método proporciona resultados con un 100% de exactitud si la estructura es toda  $\alpha$ , un 85% es  $\alpha+\beta$  y un 75% si es toda  $\beta$  (Venjaminov y Vassilenko, 1994)

#### 4.4.4. ESTUDIOS CINÉTICOS Y MECANISMO CATALÍTICO

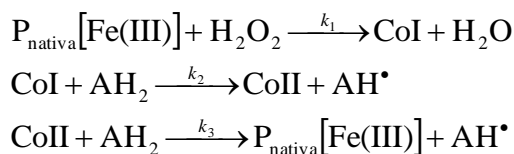
El estudio de la cinética y de la dinámica química de una enzima permite explicar los detalles de su mecanismo catalítico, su papel en el metabolismo, cómo es controlada su actividad en la célula y cómo puede ser inhibida su actividad por fármacos o venenos o potenciada por otro tipo de moléculas.

La importancia del estudio de la cinética enzimática reside en dos principios básicos. En primer lugar, permite explicar cómo funciona una enzima y, en segundo lugar, permite predecir cómo se comportará esa enzima *in vivo*. Las constantes cinéticas son los pilares fundamentales a la hora de intentar comprender el funcionamiento de las enzimas en el control del metabolismo.

##### 4.4.4.1. CINÉTICA DEL ESTADO ESTACIONARIO

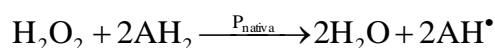
El uso de la cinética del estado estacionario es mucho más extendido que el uso del estado transitorio. Una razón es obvia: una investigación cinética del estado estacionario se puede realizar en un espectrofotómetro convencional, mientras que la mayoría de los experimentos de estado transitorio se necesita un espectrofotómetro de *stopped flow*. Los ensayos de actividad normales son cinéticas de estado estacionario.

Los tres pasos básicos de un ciclo convencional de peroxidasa son los siguientes:



**Esquema 4.2. Etapas del ciclo catalítico de las peroxidasas.**

donde  $P_{\text{nativa}}$  es la enzima en su forma nativa, que se oxida mediante un paso monoeléctrico al denominado Compuesto I (CoI). El CoI acepta un protón y un electrón del sustrato reductor ( $\text{AH}_2$ ), dando lugar a su correspondiente radical libre ( $\text{AH}^\bullet$ ) y a una forma enzimática distinta denominada Compuesto II (CoII). Finalmente otra molécula de sustrato reductor reacciona con la forma enzimática CoII, regenerando la enzima en su forma nativa y otra nueva molécula radicalaria  $\text{AH}^\bullet$ . De este modo la reacción global del ciclo catalítico es de la forma:



desde que un  $\text{H}_2\text{O}_2$  reacciona con dos  $\text{AH}_2$ , la expresión de velocidad de la reacción,  $v$ , debe reflejar la estequiometría

$$v = -\frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} = -\frac{d[\text{AH}_2]}{2dt} \quad (4.27)$$

La ecuación de velocidad de estado estacionario correspondiente al ciclo catalítico de las peroxidasas es la siguiente:

$$\frac{v}{2[\text{E}]_{\text{tot}}} = \frac{1}{\frac{1}{k_1[\text{H}_2\text{O}_2]} + \frac{1}{k_3[\text{AH}_2]}} \quad (4.28)$$

La cinética del estado estacionario está generalmente controlada por dos constantes de velocidad,  $k_1$  y  $k_3$ , las constantes de formación de CoI desde la enzima en forma nativa y la oxidación del sustrato peróxido de hidrógeno, y la velocidad de reducción del CoII, que regresa a la forma

nativa de la enzima por reducción del sustrato  $AH_2$ . La reducción de CoI es generalmente tan rápida que la concentración del estado estacionario de CoI es despreciable. Por otro lado, la concentración total de enzima se reparte principalmente entre los estados de la enzima nativo y CoII. Si la concentración de peróxido de hidrógeno es baja, entonces la formación de CoII es de velocidad controlada y la enzima nativa es la especie predominante en el estado estacionario. Si la concentración de sustrato reductor es baja, entonces el CoII es dominante en el estado estacionario.

#### 4.4.4.1.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES MICROSCÓPICAS

Un modo adecuado para la determinación de ambas constantes  $k_1$  y  $k_3$  es el reordenamiento de la ecuación del estado estacionario a la siguiente ecuación hiperbólica (Dunford, 1990):

$$\frac{v}{2[E]_{\text{tot}}} = \frac{k_3[AH_2][H_2O_2]}{\frac{k_3}{k_1}[AH_2] + [H_2O_2]} \quad (4.29)$$

$$v = \frac{A[H_2O_2]}{B + [H_2O_2]} \quad (4.30)$$

donde  $A = 2[E]_{\text{tot}} k_3 [AH_2]$  y  $B = (k_3/k_1)[AH_2]$ . La representación de los dobles recíprocos ( $1/v$  vs  $1/[H_2O_2]$ ) nos permite calcular los valores de A y B para cada concentración de sustrato. A partir de la línea recta formada ( $A = 2[E]k_1B$ ) es posible calcular el valor de  $k_1$  (constante de formación del CoI) para la reacción de oxidación de la peroxidasa.

Del mismo modo la relación de  $v$  frente a  $AH_2$  se puede definir, quedando por lo tanto:

$$\frac{v}{2[E]_{\text{tot}}} = \frac{k_1[AH_2][H_2O_2]}{\frac{k_1}{k_3}[H_2O_2] + [AH_2]} \quad (4.31)$$

$$v = \frac{A[AH_2]}{B + [AH_2]} \quad (4.32)$$



donde  $A = 2[E]_{\text{tot}} k_1 [H_2O_2]$  y  $B = (k_1/k_3)[H_2O_2]$ . La representación de los dobles recíprocos ( $1/v$  vs  $1/[AH_2]$ ) nos permite calcular los valores de A y B para cada concentración de  $H_2O_2$  durante la oxidación del sustrato. A partir de la línea recta ( $A = 2[E] k_3 B$ ) es posible calcular el valor de  $k_3$  (constante de reducción del CoII) para la reacción de la oxidación de la peroxidasa mediada por el sustrato  $AH_2$ .

A partir de la ecuación (4.31), la eficacia catalítica para la utilización de  $H_2O_2$  debería venir dada por:

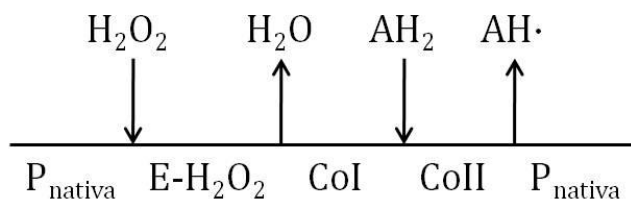
$$\frac{k_{\text{cat}}}{K_M^{\text{obs}}} = \frac{2k_3[AH_2]}{\frac{k_1}{k_3}[AH_2]} = 2k_1 \quad (4.33)$$

Mientras que la eficacia catalítica  $\left(\frac{k_{\text{cat}}}{K_M^{\text{obs}}}\right)$  para la utilización de sustratos viene dada por:

$$\frac{k_{\text{cat}}}{K_M^{\text{obs}}} = \frac{2k_1[H_2O_2]}{\frac{k_1}{k_3}[H_2O_2]} = 2k_3 \quad (4.34)$$

#### 4.4.4.1.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES MACROSCÓPICAS

Las peroxidasas siguen el clásico mecanismo bisustrato de reacción Ping-Pong Bi Bi (Figura 4.7). La caracterización de este comportamiento cinético bi-sustrato fue descrito por R. Alberty (1953) y recibió el nombre de *mecanismo ping pong* por W.W. Cleland (1969).



**Figura 4.7. Esquema del mecanismo Ping Pong Bi Bi para la peroxidasa.** Siendo los sustratos implicados en el proceso  $H_2O_2$  y  $AH_2$ .

La mayoría de las peroxidasas oxidan sustratos siguiendo el esquema 4.2. El perfil de la velocidad de reacción frente a la concentración de sustrato se ajusta bien a una *cinética Michaeliana*. Si al hacer las representaciones de dobles inversos ( $1/v$  vs  $1/C$ , siendo  $C$  la concentración de sustrato) para cada concentración del otro sustrato constante se obtiene un conjunto de rectas paralelas, este hecho indicaría que la enzima sigue un mecanismo Ping-Pong. Los ajustes lineales de dobles inversos se basan en la ecuación de Lineweaver-Burk (Lineweaver y Burk, 1934):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (4.35)$$

Así mismo, otros ajustes lineales aplicados se basan en las ecuaciones de Hanes-Woolf (Hanes, 1932) y de Eadie-Hofstee (Eadie, 1942; Hofstee, 1952):

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{[S]}{V_{\max}} \quad (4.36)$$

$$v = -K_m \frac{v}{[S]} + V_{\max} \quad (4.37)$$

La ecuación de velocidad para la enzima que cataliza la reacción según el mecanismo Ping Pong con dos sustratos  $H_2O_2$  y  $AH_2$  es

$$v = \frac{V_{\max} [H_2O_2] [AH_2]}{K_m^{H_2O_2} [AH_2] + K_m^{AH_2} [H_2O_2] + [H_2O_2] [AH_2]} \quad (4.38)$$

que puede transformarse en una hipérbola rectangular para valores fijos de  $[AH_2]$  (Everett *et al.*, 1990):

$$v = \frac{V[H_2O_2]}{K + [H_2O_2]} \Rightarrow \frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K}{V} \frac{1}{[H_2O_2]} \quad (4.39)$$

donde

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m^{\text{AH}_2}}{[\text{AH}_2]}} \Rightarrow \frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m^{\text{AH}_2}}{V_{\max}} \frac{1}{[\text{AH}_2]} \quad (4.40)$$

$$K = \frac{K_m^{\text{H}_2\text{O}_2}}{1 + \frac{K_m^{\text{AH}_2}}{[\text{AH}_2]}} \Rightarrow \frac{1}{K} = \frac{1}{K_m^{\text{H}_2\text{O}_2}} + \frac{K_m^{\text{AH}_2}}{K_m^{\text{H}_2\text{O}_2}} \frac{1}{[\text{AH}_2]} \quad (4.41)$$

Al representar la ordenada en el origen ( $1/V$ ) de las anteriores rectas paralelas (ecuación 4.39) y la inversa del parámetro ( $1/K$ ) frente al inverso de la concentración de sustrato constante  $[\text{AH}_2]$  se obtienen relaciones lineales, de cuyos ajustes de regresión se pueden determinar los parámetros cinéticos constantes de Michaelis para ambos sustratos ( $K_m(\text{AH}_2)$  y  $K_m(\text{H}_2\text{O}_2)$ ), y la velocidad máxima a la que transcurre la reacción enzimática ( $V_{\max}$ ). A partir de estos datos, se calcula el número de recambio o *turnover* ( $k_{\text{cat}}=V_{\max}/[\text{E}]_0$ ), que se define como los moles de sustrato transformados por mol de enzima y por unidad de tiempo, donde  $[\text{E}]_0$  es la concentración enzimática inicial (ecuaciones 4.40 y 4.41).

#### 4.4.4.2. INHIBICIÓN COMPETITIVA POR SUSTRATO

Generalmente en las reacciones que siguen un *mecanismo Ping Pong* se observa inhibición competitiva por sustrato a altas concentraciones de los mismos. La inhibición por sustrato resulta del enlace del sustrato a una forma errónea de la enzima que aborta la formación del complejo binario. Cuando se varía la concentración de un sustrato a concentraciones inhibitorias del otro, al hacer la representación de dobles inversos ( $1/v$  vs  $1/[\text{H}_2\text{O}_2]$ , variando  $[\text{AH}_2]$ ), se obtiene un conjunto de líneas que tienen la misma ordenada en el origen, pero distinta pendiente (Everett *et al.*, 1990). Si se representan las pendientes de esas rectas frente al inverso de las concentraciones inhibitorias, la tendencia será lineal y a partir de ella se puede calcular la correspondiente constante de inhibición ( $K_i$ ).

La aparición de la inhibición competitiva por sustrato para ambos sustratos en el mecanismo de reacción significa que en el denominador de la ecuación de velocidad (4.38), el término  $K_m^{H_2O_2}[AH_2]$  puede ser multiplicada por el término  $\left(1 + [AH_2]/K_{IS}^{AH_2}\right)$  y el término  $K_m^{AH_2}[H_2O_2]$  por  $\left(1 + [H_2O_2]/K_{IS}^{H_2O_2}\right)$  donde  $K_{IS}^{AH_2}$  y  $K_{IS}^{H_2O_2}$  son las constantes de disociación de  $AH_2$  a partir de  $EAH_2$  y de  $H_2O_2$  a partir de los complejos  $CoIH_2O_2$  y / o  $CoII H_2O_2$ , respectivamente, (4.42)), y se dará la doble inhibición competitiva por sustrato cuando se varíen las concentraciones de  $AH_2$  y  $H_2O_2$  son variadas. Por lo tanto, la ecuación de velocidad correspondiente sería:

$$v = \frac{V[H_2O_2][AH_2]}{K_m^{H_2O_2}[AH_2]\left(1 + [AH_2]/K_{IS}^{AH_2}\right) + K_m^{AH_2}[H_2O_2]\left(1 + [H_2O_2]/K_{IS}^{H_2O_2}\right) + [H_2O_2][AH_2]} \quad (4.42)$$

A valores inhibitorios constantes de las concentraciones de  $AH_2$ , los datos  $v$  vs  $[H_2O_2]$  se ajustaron a la siguiente ecuación de velocidad de inhibición competitiva:

$$v = \frac{V_{\max}[H_2O_2]}{K_m^{H_2O_2}\left(1 + \frac{[AH_2]}{K_{IS}^{AH_2}}\right) + [H_2O_2]} \quad (4.43)$$

Para una inhibición competitiva, la  $K$  y  $V$  de la ecuación (4.39) están definidas por:

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m^{AH_2}}{[AH_2]}} \quad (4.44)$$

$$K = \frac{K_m^{H_2O_2}\left(1 + \frac{[AH_2]}{K_{IS}^{AH_2}}\right)}{1 + \frac{K_m^{AH_2}}{[AH_2]}} \quad (4.45)$$

Entonces, haciendo los dobles inversos de la ecuación (4.43), las representaciones de  $1/v$  vs.  $1/[H_2O_2]$  a valores constantes de  $[AH_2]$  serán lineales y se cortarían sobre el eje y.

Además, las representaciones de  $K/V$  vs.  $[AH_2]$  serán lineales ya que:

$$\frac{K}{V} = \frac{K_m^{H_2O_2}}{V} + \frac{K_m^{H_2O_2} [AH_2]}{K_{IS}^{AH_2} V_{max}} \quad (4.46)$$

De esta última ecuación se puede determinar el valor de la constante de inhibición competitiva para el sustrato inhibidor,  $K_{IS}(AH_2)$ .

#### 4.4.4.3. INACTIVACIÓN POR SUSTRATO SUICIDA

La peroxidasa de palma reacciona con una gran variedad de sustratos reductores, utilizando  $H_2O_2$  como agente oxidante (Watanabe *et al.*, 2010; Sakharov *et al.*, 2002; Sakharov, 2004). En ausencia de sustratos reductores, un exceso de  $H_2O_2$  conduce a la inactivación de la enzima, el  $H_2O_2$ , en este caso, actúa como sustrato suicida de la enzima (Arnao *et al.*, 1990; Hiner *et al.*, 1995).

La inactivación oxidativa de las peroxidasas es el mecanismo base. El mecanismo molecular que subyace a esta inactivación mediada por el peróxido de hidrógeno es extraordinariamente compleja por el hecho de que una multitud de reacciones pueden ocurrir después de la reacción del hierro hemo con el hidropéroxido. A pesar de las peculiaridades de las diferentes peroxidasas, se puede proponer un mecanismo de inactivación común que comprende varias etapas. En ausencia de sustrato, o cuando se expone a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, las peroxidasas muestran un comportamiento cinético de inactivación suicida, en el que el peróxido de hidrógeno es el sustrato suicida que convierte al CoII en un radical libre de porfirina peroxo-Fe(III) altamente reactivo denominado compuesto III (CoIII) (Nakaijima *et al.*, 1987). El CoIII no es parte del ciclo

de la peroxidasa, sino que se produce bajo la exposición excesiva del CoII protonado a las especies reactivas de oxígeno en una reacción mediada por el radical libre superóxido (Adediran *et al.*, 1987).

#### 4.4.4.3.1. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE RECAMBIO (r) PARA LA INACTIVACIÓN POR H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Utilizando las representaciones de la actividad residual en tanto por ciento para cada sustrato frente a la relación [peróxido]/[enzima], la proporción requerida en cada caso para la inactivación del 100% puede obtenerse a partir de la intersección de la línea de regresión con el eje x. A partir de este valor, el número de recambio r se puede calcular utilizando la siguiente ecuación:

$$A_R = \frac{A_t}{A_o} = 1 - \frac{1}{1+r} \frac{[H_2O_2]}{[CEP]} \quad (4.45)$$

donde  $A_R$  es la actividad residual;  $A_t$  y  $A_o$  son las actividades a tiempo (t) (final de la reacción) y cero respectivamente; (r) es el número de recambio (número de ciclos dados por la enzima antes de la inactivación) y  $[H_2O_2]$  y  $[CEP]$  son las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de enzima. Los valores actuales de r se obtienen teniendo en cuenta el consumo de 2 moles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cada ciclo catalítico.

#### 4.4.4.3.2. CINÉTICA DE INACTIVACIÓN POR H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La inactivación se sigue a lo largo del tiempo para la enzima por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un rango de diferentes concentraciones. La representación de los logaritmos de los porcentajes de actividad residual ( $\ln A_R$ ) frente al tiempo se ajusta a líneas rectas, con pendientes equivalentes a las constantes observadas de velocidad de primer orden de inactivación ( $k_{obs}$ ):

$$\ln \frac{[A_a]}{[A_o]} = -k_{\text{obs}} t \quad (4.46)$$

La naturaleza hiperbólica de los gráficos de  $k_{\text{obs}}$  frente a la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que se observa en el proceso apunta a una cinética de saturación. De este modo, para el cálculo de las constantes de inactivación se usa la siguiente ecuación:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{inac}}^{\text{ap}} [\text{H}_2\text{O}_2]}{K_{\text{I}}^{\text{ap}} + [\text{H}_2\text{O}_2]} \quad (4.47)$$

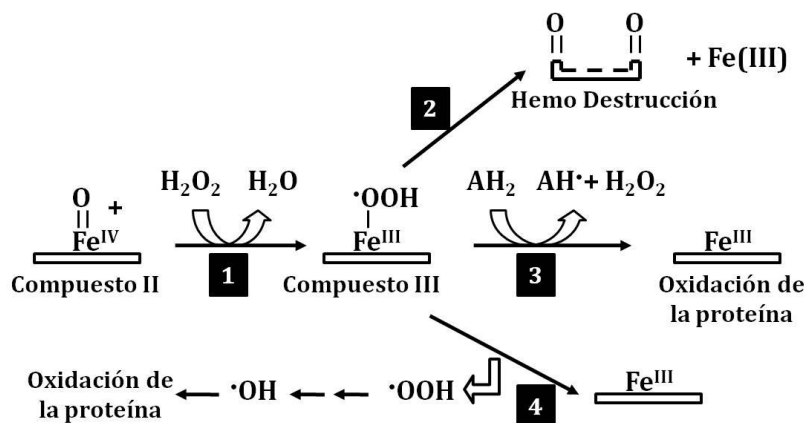
donde los valores de  $k_{\text{obs}}$  (constante de velocidad de primer orden) (Arnao *et al.*, 1990) se obtienen del ajuste por regresión lineal a los dobles recíprocos de la ecuación 4.47, así como los valores de  $k_{\text{inac}}^{\text{ap}}$ , constante de primer orden de inactivación y  $K_{\text{I}}^{\text{ap}}$ , constante de unión al inhibidor.

El modelo es en realidad una simplificación del enfoque cinético completo desarrollado previamente por Arnao y coautores (Arnao *et al.*, 1990; Hiner *et al.*, 1996), pero ofrece una aproximación razonablemente adecuada a efectos comparativos como se requiere.

#### 4.4.4.3.3. MODELO DE INACTIVACIÓN

En ausencia de sustrato, o cuando se expone a altas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , las peroxidasas muestran un comportamiento cinético de inactivación suicida, en la que el peróxido de hidrógeno es el sustrato suicida, que convierte a CoII en una especie altamente reactiva denominada compuesto III (CoIII) (Camino 1 en la Figura xxx6). El CoIII no es parte del ciclo de la peroxidasa pero se produce en condiciones de excesiva exposición del CoII protonado a especies oxidativas en una reacción parcialmente mediada por un radical libre superóxido (Adediran y Lambeir, 1989; Nakajima y Yamazaki, 1987; Keilin y Mann, 1937).

La adición de un exceso de sustrato reductor se opone a la inactivación suicida al competir con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  por el CoII (Hiner *et al.*, 2000; Hiner *et al.*, 1995). Una vez formado el CoIII, se podrían dar las tres alternativas de descomposición (vías 2, 3 y 4, Figura 4.8).



**Figura 4.8.** Vías alternativas para la inactivación suicida por  $\text{H}_2\text{O}_2$  a partir de la formación del compuesto intermedio denominado compuesto III (CoIII).

En primer lugar, dada la proximidad de los radicales peroxilo del CoIII del anillo porfirina, es razonable sospechar que una vez formadas estas especies reactivas se llega a una estructura tetrapirrólica y se oxida la porfirina (vía 2 en la Figura 4.8) (Hiner *et al.*, 2000; Nagababu y Rifkind, 2000; Catalano *et al.*, 1989; Spector *et al.*, 2000; Lambeir y Dunford, 1985; Mahy *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1999). Los compuestos hemos son particularmente susceptibles a sistemas de anillos de biliverdina por ataque oxidativo en las posiciones meso, y la dependencia de este proceso con el peróxido exógeno se ha demostrado (Sigman *et al.*, 2001). La oxidación conduce fácilmente a la ruptura o eliminación de los puentes de carbono unidos a anillos tetrapirrólicos y resulta en la escisión del macrociclo de porfirina y forma una estructura de silla abierta tetrapirrólica (Nakajima y Yamazaki, 1987; O'Carra, 1975; Brown, 1976). La liberación del hierro hemo durante la formación de estas especies confirma que éstas están asociadas con la degradación.

En segundo lugar, el CoIII puede regresar al estado fundamental después de la catálisis oxidativa de la proteína, produciendo un grupo por



el lado de la cadena del aminoácido oxidado (vía 3 en la Figura 4.5) (Cai y Tien, 1989). Alternativamente, el electrón donado puede ser de una molécula de sustrato, en cuyo caso la porfirina sería reparada y resultaría un estado fundamental (Dordick *et al.*, 1986).

Por último, la liberación espontánea de los radicales libres por descomposición unimolecular de CoIII es factible porque el radical peroxil no está covalentemente unido a la porfirina. Esta propuesta se comprueba experimentalmente en presencia de exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en ausencia del sustrato reductor, el CoIII se comporta irreversiblemente debido a la formación de especies reactivas de oxígeno (Hiner *et al.*, 1995; Bayton *et al.*, 1994; Arnao *et al.*, 1990; Adediran, 1996; Ximenes *et al.*, 2001). Una vez liberado, dos moléculas de radicales libre superóxido se puede reordenar espontáneamente en especies tetraóxido de corta vida que se descomponen en dos moléculas de radicales libres hidroxilo y una de oxígeno (Adediran, 1996). Los radicales hidroxilo libres son más reactivos que los peroxilo, y son más solubles y potencialmente más oxidantes sobre las cadenas laterales de los aminoácidos.

#### **4.4.5. CRISTALIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA PROTEÍCA POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X**

La importancia de los métodos de difracción de rayos-X en Enzimología no será nunca suficientemente exaltada. No sólo han proporcionado la base experimental de nuestro conocimiento actual sobre la estructura de las proteínas, sino que son uno de los factores más importantes en la investigación de los mecanismos enzimáticos.

Los rayos X son dispersados al golpear los electrones de los átomos en una forma similar a como las ondas luminosas son dispersadas por las líneas de una red de difracción. El retículo regular de un cristal actúa como una red de difracción tridimensional frente a un haz monocromático de rayos-X, produciendo un patrón de rayos difractados en direcciones en las que los rayos dispersados se refuerzan y no interfieren destructivamente.

La estructura del cristal, o más precisamente, la distribución de su densidad electrónica puede calcularse a partir de un patrón de difracción mediante la transformación de Fourier. Esto requiere el conocimiento de las intensidades y direcciones de los rayos difractados, que pueden medirse fácilmente como un patrón de manchas sobre la película fotográfica o con un difractómetro, y también de sus *fases*. La determinación de la fase de cada rayo difractado (un requisito esencial para la transformación de Fourier) es el problema más difícil. Soluciones para obviar este problema, que fueron utilizadas para estructuras cristalinas sencillas, no pudieron aplicarse a proteínas. La solución del *problema de las fases* fue el obstáculo que frenó la cristalografía de proteínas hasta que Perutz y sus colaboradores aplicaron el método del reemplazamiento isomórfico en 1954. En este método, un átomo metálico pesado se une a sitios específicos en el cristal sin modificar su estructura o empaquetamiento. El metal dispersa los rayos X más fuertemente que los átomos de la proteína y adiciona su poder de dispersión a cada rayo difractado por las proteínas a partir de cambios de intensidad, según sean reforzados o disminuidos por la dispersión del átomo pesado. Se necesitan varias sustituciones isomórficas diferentes para proporcionar una determinación precisa de las fases (Fersht, 1980)..

La cristalografía de proteínas es la técnica líder para la determinación de estructuras tridimensionales a nivel molecular, sin embargo, la extrapolación de la función de la proteína a partir de las coordenadas atómicas dista de ser sencilla. Las características del cristal como el contenido de solvente, el pH, la fuerza iónica, los contactos cristalinos, la dosis absorbida, la resolución, etc., deben ser meticulosamente analizados para poder sustentar hipótesis con implicaciones biológicas y/o funcionales. Tradicionalmente se ha considerado que las coordenadas atómicas generadas después de resolver el problema de las fases y de construir un modelo sobre la densidad electrónica, es la única información generada a partir de los datos cristalográficos. No obstante, estas coordenadas son un promedio espacial y temporal de todas las moléculas que conforman al cristal, de manera

que, el modelo final contiene también información sobre la variabilidad conformacional dentro del cristal (representada o contenida en los parámetros de desplazamiento atómico). Diferentes métodos de refinamiento toman en consideración esta variabilidad (e.g. modelos isotrópicos, anisotrópicos y TLS) Esta información conformacional puede ser extraída, analizada y transformada en “movimientos” (información dinámica) de la estructura proteica. El análisis de los parámetros de desplazamiento atómico se ha aplicado a estructuras cristalográficas de enzimas que exhiben comportamientos cinéticos cooperativos. Los resultados muestran que los movimientos de las proteínas están claramente relacionados con el mecanismo catalítico o la transición alostérica de ciertas enzimas (De la Mora Lugo y Rudiño Piñera, 2008).

#### **4.4.5.1. CRISTALIZACIÓN DE *Chamaerops excelsa***

La CEP (purificada y liofilizada) fue resuspendida en 50 mM de tampón Tris a pH 8,0 a una concentración de 10 mg mL<sup>-1</sup>. El muestreo de cristalización se llevó a cabo automáticamente con el robot de cristalización Honeybee 931 (Genomic Solutions Inc) usando una variedad de muestreadores comerciales (Qiagen). Se formaron gotas de 2 µL de volumen final (1:1 relación de la proteína y solución madre) utilizando la técnica de difusión de la gota colgante y manteniendo la temperatura a 291 K. El grupo de cristales creció en una solución que contenía sulfato amónico, tampón Tris, polietilenglicol, éter monomérico (PEG MME) 2000 y glicerol como precipitante. Los intentos de optimización de cristalización se llevaron a cabo ambos en placas para la gota colgante (24-well Linbro plates) (Textor *et al.*, 2011).

#### **4.4.5.2. RECOGIDA DE DATOS Y PROCESADO**

El conjunto de cristales de las placas se separa mediante una aguja de acupuntura y un único cristal de CEP se trasladó al crioprotector de composición similar a la solución de crecimiento de cristales, aunque con

un 20% de glicerol en su lugar. El cristal de proteína se recogió con un crioloop y se congelaba directamente en corriente de nitrógeno antes de la recogida de los datos de rayos-X. Los datos de difracción se recogieron sobre la línea MX2 en el laboratorio Synchrotron Light Source LNLS, Campinas (Brazil) usando un detector MAR CCD (Guimaraes *et al.*, 2009). Se obtuvo un conjunto de datos de 108 grados de cobertura con una longitud de onda de 1,46 Å usando el método de oscilación con un rango angular de 0,4°. La integración de los datos y el escalado se llevaron a cabo con el programa XDS (Kabsch, 2004). El reemplazamiento molecular se efectuó con el programa Phaser (McCoy *et al.*, 2007) y la construcción del modelo y el refinamiento con el programa Coot (Emsley *et al.*, 2010) y Refmac5 (Vagin *et al.*, 2004), respectivamente (Textor *et al.*, 2011).



## **PARTE V**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

*(...) casi siempre los hombres que realizan esos inventos fundamentales de nuevo paradigma han sido muy noveles en el campo cuyo paradigma cambian (...) Se trata de hombres, que al no estar muy comprometidos con las reglas tradicionales de la ciencia normal debido a que tienen poca práctica anterior, tienen muchas probabilidades de ver que estas reglas no definen ya un juego que puede continuar adelante y de concebir otro conjunto que puedan reemplazarlo.*

*Thomas S. Kuhn. 1962. Estructura de la Revolución Científica.*



## 5.1. PROCESO DE PURIFICACIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMERA *Chamaerops excelsa*

Para llevar a cabo el proceso de purificación se ha seguido el esquema desarrollado por Zamorano y co-autores (2008, 2009) para la peroxidasa de palma real, con ciertas modificaciones que han mejorado notablemente el proceso (Textor *et al.*, 2011; Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011). Se han introducido un paso intermedio entre la cromatografía hidrofóbica y la de intercambio iónico y un proceso de filtración en gradiente para eliminar restos de impurezas y para que de este modo la proteína entre más limpia en el proceso de intercambio iónico. Además, el proceso anterior utilizaba como resina de intercambio iónico DEAE-Toyopearl 650 M (Tosoh Co., Tokyo, Japan), resina que ha sido sustituida por TSK-gel DEAE-5PW (Tosoh Co., Tokyo, Japan) que es mucho más selectiva y que proporciona una resolución mayor debido a que el tamaño de partícula es de 20-40  $\mu\text{m}$  comparada con los 40-90  $\mu\text{m}$  de la resina anterior (<http://www.separations.us.tosohbioscience.com>).

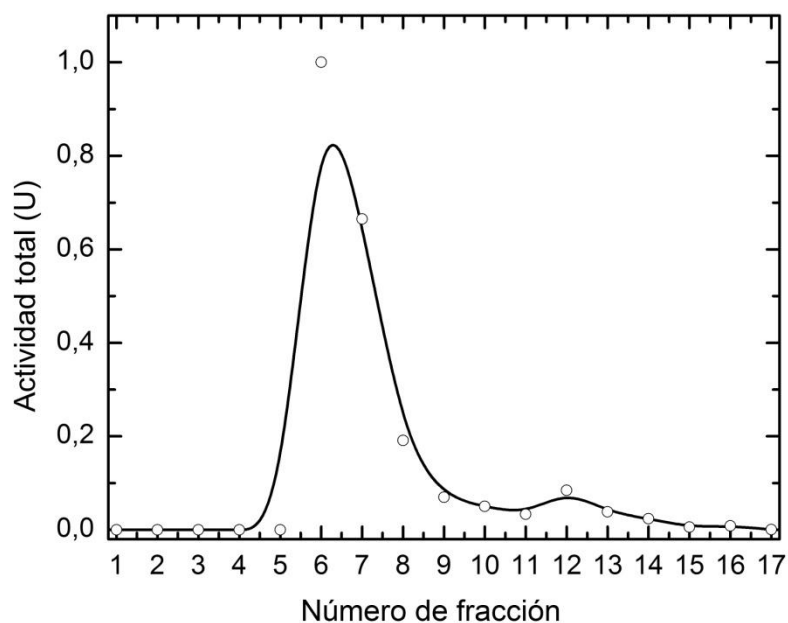
### 5.1.1. CROMATOGRAFÍA HIDROFÓBICA

La cromatografía hidrofóbica se realiza con un equipo de baja presión sin conexión alguna a un sistema de medida de absorbancias. Por ello, el único modo de hacer un seguimiento proteico en el eluido es a través de la medida de la actividad enzimática en cada una de las fracciones recogidas (15,0 mL) (Figura 5.1) Con este proceso se elimina gran cantidad de proteínas diferentes y de pigmentos.

La fase móvil ( $F_M$ ) que se utiliza es el tampón fosfato 100 mM, pH 6,5, 1,7 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . La peroxidasa se retiene en la fase estacionaria ( $F_S$ ) Phenyl-Sepharose CL-4B (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) mediante una interacción de tipo hidrofóbico y, cuando se ha saturado, se eluye reduciendo de forma drástica la concentración salina con fosfato 100 mM, pH 6,5, 0,2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . De este modo, el cromatograma, comúnmente denominado *pool*, es más estrecho que el que



aparece cuando se utiliza un gradiente salino lineal. La peroxidasa suele encontrarse entre las fracciones 7-16 (~100-250 mL de volumen de elución). En comparación con los 60 mL de volumen de elución de la peroxidasa de palma real *Roystonea regia* (Zamorano, 2009), la enzima aparece más tarde. La velocidad de flujo es de  $\sim 1\text{ mL min}^{-1}$ .



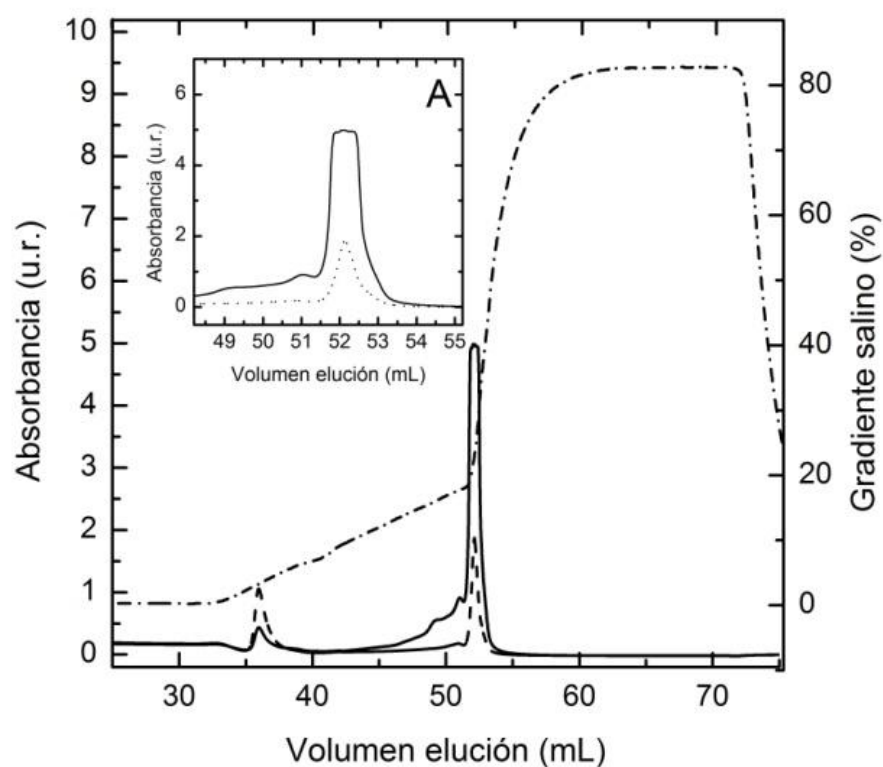
**Figura 5.1. Cromatograma hidrofóbico registrado por medidas de actividad enzimática.** Se usan como sustratos guayacol y peróxido de hidrógeno. Cada fracción tiene un volumen de 15,0 mL.

### 5.1.2. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

La cromatografía de intercambio iónico se lleva a cabo con un equipo ÄKTA<sub>FLP</sub>, utilizando como  $F_S$  la resina TSK-gel DEAE-5PW. Se utiliza como  $F_M$  tampón TRIS-HCl 5,0 mM, pH 9,3. La peroxidasa a este pH de trabajo se encuentra cargada negativamente ( $pI = 6,6 \pm 0,1$ ), por lo que se retiene en la columna, uniéndose su forma aniónica a los grupos DEAE (dietilaminoetil) cargados positivamente. La proteína se eluye con un gradiente lineal de NaCl 0-300 mM utilizando tampón TRIS-HCl 5,0 mM, pH 9,3, 1,0 M NaCl. Este equipo tiene un detector que permite registrar las absorbancias a diferentes longitudes de onda durante el proceso. Se eligen

280 nm (banda característica de las proteínas, debido a la presencia de aminoácidos aromáticos) y 403 nm (banda Soret en las peroxididas de clase III, debido a la presencia en su estructura de al menos un grupo hemo), de este modo, se puede saber, en qué fracciones se encuentra la peroxidasa. Otro dato a tener en cuenta es que en las peroxididas la banda Soret suele tener una absorbancia de un orden tres veces superior a la absorbancia a 280 nm. En el cromatograma, por tanto, se observa que la banda proteica aparece entre los 30 y los 32 mL (Figura 5.2).

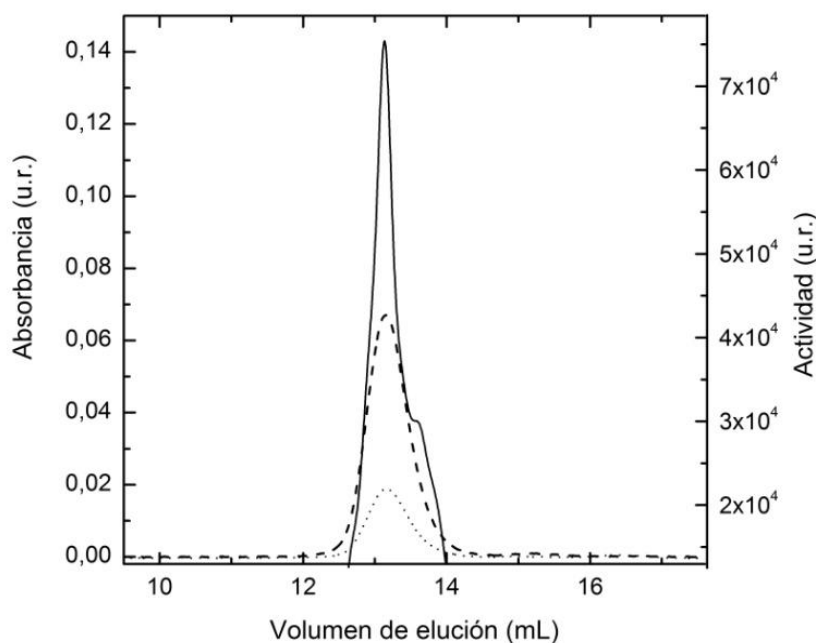
Es una cromatografía muy sensible y una conductividad superior a  $3 \text{ mS cm}^{-1}$ , durante la inyección de la muestra, no permite la unión de la proteína a grupos DEAE. Se recogen fracciones de  $500 \mu\text{L}$ .



**Figura 5.2. Cromatograma FLP.** Cromatografía de intercambio iónico con TSK-gel DEAE-5PW.

### 5.1.3. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

La cromatografía de exclusión molecular se realiza en un equipo ÁKTA<sub>FLP</sub>, utilizando como F<sub>S</sub> Superdex 200 10/30 HR, y como F<sub>M</sub> tampón TRIS-HCl 5,0 mM, pH 9,3. Se trabaja a una velocidad de flujo de 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Se inyectan volúmenes de 400 µL y se recogen fracciones de 250 µL. Las fracciones que forman el cromatograma se identifican por seguimiento de la absorbancia a 280 y 430 nm y, al igual que en la cromatografía anterior, también se registra la actividad de las fracciones. Como *pool* cromatográfico se toman las fracciones B-6 a C-3.



**Figura 5.3. Cromatografía de exclusión molecular con Superdex 200. Cromatograma FLP.** Registrado por medidas de actividad (línea negra). La línea discontinua y la línea de puntos representan las absorbancias 403 y 280 nm, respectivamente.

### 5.1.4. RENDIMIENTO DE LA PURIFICACIÓN

En la tabla de rendimientos se puede observar la efectividad de cada una de las etapas usadas durante la purificación de la peroxidasa (*Chamaerops excelsa*) (Tabla 5.1). En un proceso de purificación que parte de material vivo, un rendimiento de un 33% y un grado de pureza de un

3,5 son muy buenos valores. Normalmente en el caso de purificaciones vegetales con tal grado de pureza suele darse un rendimiento alrededor de un 10-20%. Hay que añadir que se está purificando una proteína, que como todas, se desnaturaliza con el tiempo y que el proceso de purificación es bastante largo (15 días). Ello es debido a que para obtener una masa proteica adecuada para realizar el resto de experimentos se requiere iniciar el proceso con una gran cantidad de masa vegetal. Aunque algunas etapas se realizan en cámara fría (4-5 °C) para proteger la enzima, otras en cambio funcionan mejor a temperatura ambiente.

**Tabla 5.1. Rendimientos en el proceso de purificación de la peroxidasa de palma *Chamaerops excelsa* (Zamorano *et al.*, 2009).** Siendo, V el volumen, C<sub>p</sub>, cantidad de proteína, A<sub>T</sub>, la actividad total, A<sub>E</sub> la actividad específica, F<sub>p</sub> el factor de purificación y R el rendimiento.

Etapa	V (mL)	C <sub>p</sub> (mg)	A <sub>T</sub> (U)	A <sub>E</sub> (U mg <sup>-1</sup> )	F <sub>p</sub>	R (%)
Homogenado	6020	27515	211469	7,7	1	100
PEG+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2750	9466	199898	21,1	3	95
Phenyl-Sepharose	54	662	138230	209,9	27	66
TSK-gel 5PW	2,5	27	79879	2925,9	380	38
Superdex 200	20	11	69231	6293,7	817	33

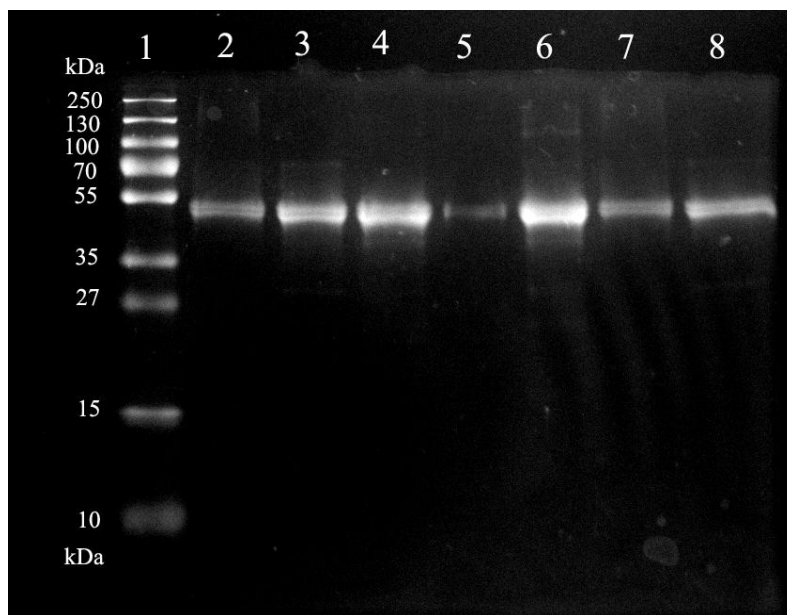
A lo largo de este estudio, se han realizado, en diferentes épocas del año, 4 purificaciones de peroxidasa de *Chamaerops excelsa*. Los rendimientos han oscilado entre 30-40%. Cuando se ha purificado en otoño-invierno, el rendimiento ha sido menor que cuando se hace en primavera-verano.

## 5.2. CARACTERIZACIÓN DE LA PEROXIDASA *Chamaerops excelsa*

### 5.2.1. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Cuando se purifica, es necesario, en primer lugar, conocer el grado de pureza de la sustancia purificada. Existen diferentes metodologías, una de las más utilizadas en los laboratorios es la electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), con la que además de poder determinar el grado de pureza, se puede conocer la masa molecular de la misma, con un error del 10%.

Las peroxidases son enzimas cuyas masas moleculares oscilan entre los 10 y los 55 kDa. La utilización de geles al 10% sería suficientemente resolutive.

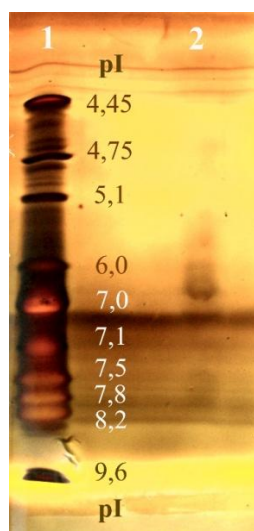


**Figura 5.4. SDS-PAGE al 12%.** 1: bandas de las proteínas del marcador de masas moleculares de Page Ruler™ prestained Protein Ladder (Fermentas, Berkshire, UK). 2-7: peroxidasa de palma *Chamaerops excelsa* en las distintas purificaciones.

En la Figura 5.4 se puede observar que es una técnica bastante fiable para determinar la masa molecular de la proteína, ya que en las diferentes purificaciones realizadas a lo largo del año, la línea se mantiene constante, lo cual indica que su masa molecular es  $54 \pm 3$  kDa. La única diferencia observable en la figura es el grosor de la banda que corresponde con la concentración de proteína empleada en el ensayo. Este valor de masa molecular es característico de peroxidadas, ya que si la comparamos con la de palma real es un valor bastante parecido, siendo éste de  $48 \pm 3$  kDa (Zamorano, 2009).

### 5.2.2. DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO

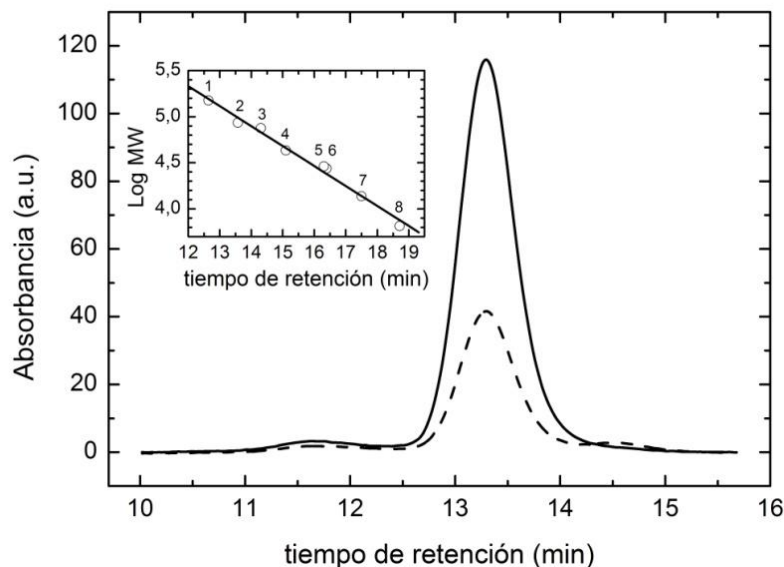
Con la técnica del isoelectroenfoque (IEF) se puede determinar el punto isoeléctrico (pI) de una proteína y saber si una muestra presenta diferentes isoenzimas, es decir, diferentes formas de una misma enzima que suelen catalizar la misma reacción pero presentan diferencias en sus propiedades catalíticas, cinéticas, a veces en su cadena polipeptídica, su carga eléctrica neta nula. Es un dato muy importante para la elección de los pH's de trabajo en las diferentes etapas del fraccionamiento cromatográfico, así como para realizar diferentes estudios cinéticos y de estabilidad.



**Figura 5.5. IEF con tinción con el kit Silver Stain Plus. 1.** Bandas de las proteínas de pI de IEF Standars (Bio-Rad Laboratories, Inc.) **2.** Banda de la peroxidasa *Chamarops excelsa* a un pI de 6,8..

### 5.2.3. DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE AGREGACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.

Con este método se determinará la masa molecular de la peroxidasa CEP en estado nativo. Conocido el volumen o tiempo de elución de los marcadores de masa molecular, se podrá determinar el de la proteína de interés. La mayor parte de las peroxidases vegetales tienen una masa molecular en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de 10-55 kDa. La CEP, mediante SDS-PAGE, presenta una única banda de  $54 \pm 3$  kDa, debiéndose esta elevada masa molecular al elevado porcentaje de glicosilación de la proteína. El volumen de elución de la CEP indica que la proteína se encuentra en forma dimérica en disolución. Estos dímeros tienen una masa molecular de  $109 \pm 3$  kDa (Figura 5.6).



**Figura 5.6. Cromatograma de filtración en gel utilizando Superdex 200 HR 10/30 (Zamorano *et al.*, 2009).** La velocidad de flujo a la que se ha trabajado es de  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ . En el gráfico, la línea continua y la línea discontinua corresponden a las absorbancias a 403 y 280 nm, respectivamente. El cuadro inserto en la figura es la recta de calibrado utilizada para la determinación de la masa molecular de CEP. CEP tiene una masa molecular, estimada con este método, de 109 kDa.

## 5.3 ESTABILIDAD DE LA PEROXIDASA DE PALMA

### *Chamerops excelsa*

#### 5.3.1 DESNATURALIZACIÓN INDUCIDA POR EL pH

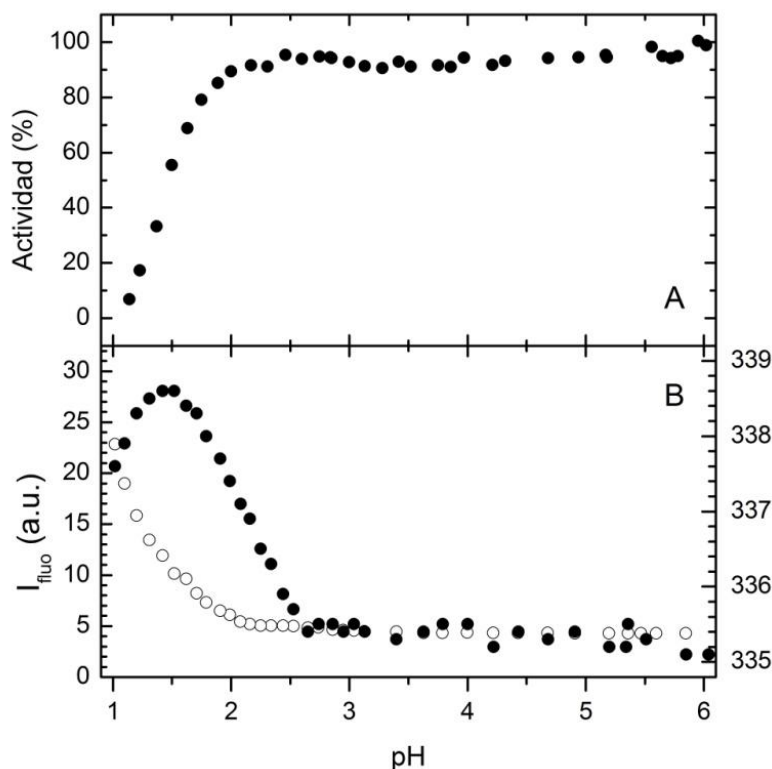
La estabilidad estructural y la actividad enzimática de las peroxidases dependen del pH de la disolución (Tams y Welinder, 1996; Pina *et al.*, 2001; Zamorano *et al.*, 2004, 2008). Aunque las peroxidases de plantas han sido estudiadas durante muchos años, la información sobre el efecto del pH en su comportamiento es bastante limitada. Para elegir el pH idóneo al que se realizarán los estudios de estabilidad proteica, se medirá el efecto del pH sobre la actividad enzimática (usando guayacol como sustrato) y sobre la fluorescencia intrínseca del triptófano en CEP (Figura 5.7). Se puede observar que CEP es una enzima que muestra estabilidad en el rango de pH de 2,5 a 6,0 sin cambios significativos en su actividad catalítica y en sus parámetros fluorescentes.

Uno de los parámetros más significativos, debido a su utilidad, del espectro de fluorescencia de una proteína es la posición del máximo ( $\lambda_{\max}$ ), que refleja el grado de accesibilidad de las moléculas del disolvente a los cromóforos (Permyakov, 1993). Se observa que dicho parámetro permanece constante (con una variación de  $\pm 0,2$  nm) en un rango de pH comprendido entre 2,8 y 6. Esto indica que la accesibilidad de las moléculas de agua a las cadenas laterales de los triptófanos de la proteína permanece inalterada en este rango de pH. La intensidad de fluorescencia tampoco se ve alterada en este rango de pH (Figura 5.7B). De este modo, el rango de pH de 3 a 6, caracterizado por la ausencia de cambios evidentes en los parámetros fluorescentes y en la actividad enzimática, parece ser el rango correcto a elegir para la caracterización químico-física de la CEP.

La acidificación de la solución de proteína hasta un pH inferior a 2 provocó un cambio de 36 nm en el rojo del espectro de fluorescencia, seguido por un desplazamiento al azul por debajo de pH 1,5, producida por la agregación de proteínas y un marcado aumento (más de cuatro veces) en la intensidad de fluorescencia. La comparación de los



parámetros fluorescentes con los cambios en la actividad enzimática indican que sólo la intensidad de fluorescencia está relacionada con la desnaturalización ácida de CEP, mientras que la posición del máximo del espectro de fluorescencia, que refleja la polaridad de la cadena lateral del triptófano, no es relevante para la función enzimática de CEP (Zamorano *et al.*, 2009).



**Figura 5.7. Efecto del pH sobre la actividad enzimática (A) y sobre los parámetros de fluorescencia (B) de la CEP (Zamorano *et al.* 2009).** Las medidas se llevaron a cabo en tampón universal 10 mM ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-NaOH}$ ) con una concentración de proteína de ca. 10  $\mu\text{M}$ . **A.** Efecto del pH sobre la actividad enzimática de CEP a 25 °C. La actividad se llevó a cabo junto con guayacol. **B.** Efecto del pH sobre los parámetros de fluorescencia de CEP a 25 °C. Los círculos abiertos en representa la intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias) a 350 nm, la cual es proporcional a la cantidad de producto formado, y los círculos cerrados corresponden a la posición del máximo del espectro de fluorescencia  $\lambda_{max}$ . La longitud de onda de excitación fue 296 nm.

Estudios de la misma índole realizados con otras peroxidases de plantas concluyen del mismo modo: la peroxidasa de rábano (Pina *et al.*, 2001) es estable en el margen de pH comprendido entre 3,0 y 5,0, la

desnaturalización ácida va acompañada de un incremento de la intensidad de fluorescencia y una reducción de la absorbancia a 403 nm (lo que es igual a una reducción de la actividad enzimática); la peroxidasa aniónica de cacahuete (Zamorano *et al.*, 2004) es estable en un rango comprendido entre 3,0 y 11,0, la desnaturalización ácida y básica provoca reorientación del grupo hemo con respecto de los aminoácidos aromáticos, aumentando la intensidad de fluorescencia, pero en cambio la posición del máximo permanece prácticamente constante; la peroxidasa de palma real (Zamorano *et al.*, 2008) es estable en un margen de pH comprendido entre 2,0 y 13,0, la desnaturalización ácida es debida también a una reorientación del grupo hemo con respecto de los aminoácidos aromáticos, la polaridad de éstos no se ve alterada, ya que el máximo de emisión permanece constante. Todas las peroxidases de plantas son estables en rangos de pH bastante amplios.

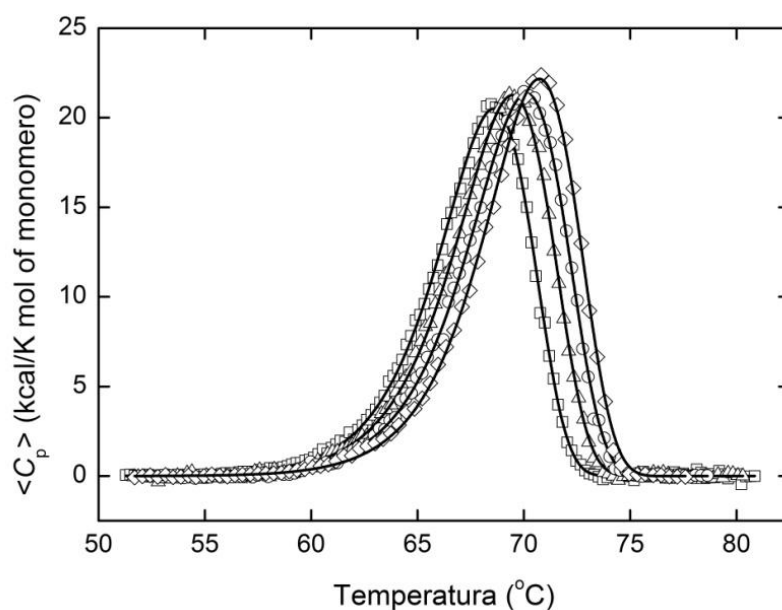
### **5.3.2. DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA MEDIANTE CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO**

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una de las técnicas experimentales más fiables para estudiar los cambios conformacionales que se producen en las biomacromoléculas inducidos por la temperatura. Se registrará el perfil calorimétrico de CEP a pH 3,0. Los datos experimentales se ajustarán con la herramienta MicroCal Inc del programa ORIGIN (Northampton, MA) a diferentes modelos, que determinarán el proceso que sigue la proteína durante su desnaturalización térmica.

La síntesis en condiciones óptimas para el medioambiente o “síntesis verde” del polielectrolito polianilina se realiza a pH 3,0 (Caramyshev *et al.*, 2005). De este modo, encontrar las peroxidases más estables a este pH mejoraría el rendimiento de este proceso. Este es uno de los motivos por los que se realizan estudios de desnaturalización a este pH concreto. Otro de los motivos son los pares iónicos, ya que contribuyen en gran medida a la estabilidad de las proteínas con grupo hemo. Cuando

se estudia la desnaturalización a pH ácido, estos pares iónicos desaparecen por protonación y de ese modo se determina la contribución de estas estructuras a la estabilidad proteica.

La desnaturalización térmica de CEP a pH 3,0 dio lugar a transiciones DSC bien definidas, cuyas temperaturas con máximos del exceso de capacidad máxima ( $T_m$ ) dependen de la velocidad de barrido. Este efecto se puede observar en la Figura 5.8, la cual muestra las transiciones de CEP a cuatro velocidades diferentes de barrido.



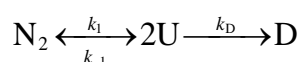
**Figura 5.8. Dependencia con la temperatura del exceso de capacidad calorífica de CEP a diferentes velocidades de calentamiento (Zamorano *et al.*, 2009).** 29,7 K h<sup>-1</sup> (cuadrados), 45,5 K h<sup>-1</sup> (triángulos), 59,3 K h<sup>-1</sup> (círculos) y 87,5 K h<sup>-1</sup> (diamantes) en tampón citrato 20mM, pH 3,0. Las líneas sólidas representan el mejor ajuste de cada curva experimental usando la ecuación (4.24). La concentración de la proteína fue 23,9  $\mu\text{M}$ .

La desnaturalización de CEP en estas condiciones experimentales fue siempre calorimétricamente irreversible ya que en un segundo calentamiento de la solución de la enzima no se observaron efectos térmicos. Todo esto indica claramente que las transiciones térmicas observadas caracterizan procesos irreversibles cinéticamente controlados. Tras los datos de cromatografía de exclusión que concluían que la CEP forma dímeros en solución, la desnaturalización inducida térmicamente

debe ir acompañada de su disociación en subunidades, la cual debería producir una dependencia de  $T_m$  con la concentración (Manly *et al.*, 1985; Freire, 1989; Sánchez-Ruiz, 1992). De hecho, se encontró que los valores de  $T_m$  y  $\Delta H_{cal}$  para la desnaturalización térmica de CEP a pH 3,0 son dependientes de la concentración de proteína en un rango entre 0,4-2,6 mg mL<sup>-1</sup> (datos no mostrados),  $T_m$  se incrementó en 1,1 grados, y  $\Delta H_{cal}$  en un 2%. La relación entre las entalpías de van't Hoff y calorimétrica obtenidas a diferentes concentraciones y diferentes velocidades de barrido dio un valor promedio de  $1,36 \pm 0,08$ , bastante cerca de los valores calculados con la ecuación:

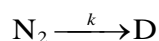
$$\frac{\Delta H_{VH}}{\Delta H(T_m)} = \frac{2n}{n+1} \quad (5.1)$$

que es válida para el caso en el que la desnaturalización de las proteínas oligoméricas está acoplada a un proceso de disociación-desnaturalización de sus monómeros (Freire, 1989). Esta relación de entalpías toma el valor de 1,333 para dímeros. En consecuencia, a pesar de las pequeñas variaciones en los parámetros cinéticos de la desnaturalización de CEP con la concentración, en todos los experimentos realizados a este pH se ha usado la misma concentración de proteína para estar seguros que los resultados obtenidos en los diferentes experimentos sean independientes de la concentración. El análisis de las transiciones DSC en estas condiciones se base en el modelo simple de dos estados (ver materiales y métodos). Cabe señalar que un modelo realista de la desnaturalización de las proteínas, en este caso, debe incluir dos pasos: una disociación reversible (desplegamiento) del dímero en monómeros, seguido de una alteración irreversible de esos monómeros hasta un estado desnaturalizado final desde el que no puede retornar al estado nativo. Este esquema, generalmente conocido como el modelo de Lumry-Eyring (Lumry y Eyring, 1954) en el caso de proteínas diméricas, puede ser descrito como:



donde  $N_2$  es el dímero nativo, U es el monómero desplegado. D es el monómero desnaturalizado en el proceso irreversible,  $k_1$  y  $k_{-1}$  son las constantes de velocidad de las reacciones directa e inversa de desplegamiento acompañado de disociación y  $k_D$  es la constante de velocidad de la desnaturalización irreversible de los monómeros.

La utilización del modelo completo de Lumry-Eyring para una descripción cuantitativa de la transición inducida por la temperatura es muy difícil porque el sistema de ecuaciones diferenciales no tiene solución analítica a varias temperaturas. Por ello, es necesario aplicar un modelo más simple, que será un caso particular del modelo de Lumry-Eyring. Consistirá en un único paso irreversible, donde el dímero nativo dará lugar a los monómeros desnaturalizados. Esta aproximación es posible suponiendo que la desnaturalización del monómero es un paso muy rápido en comparación con la disociación del dímero y la asociación de los monómeros desplegados:  $k_D \gg k_1$  y  $k_D \gg k_{-1}$ . Esto quiere decir que la ruptura de la estructura cuaternaria de los dímeros se comporta de acuerdo a la ley cinética “todo o nada”:



donde  $N_2$  es el dímero nativo, D es el monómero desnaturalizado y  $k$  es la constante de velocidad efectiva del proceso de desnaturalización que varía con la temperatura de acuerdo con la ecuación de Arrhenius (4.20).

Las funciones obtenidas para el exceso de capacidad calorífica obtenidas para CEP se analizaron mediante el ajuste de datos al modelo irreversible de dos estados (4.24), ya sea individualmente o de forma global, utilizando el tipo de análisis como una variable adicional. Los resultados del ajuste se muestran en la Figura 5.8 (líneas sólidas) y en la Tabla 5.2. Los intentos de incluir diferentes modelos irreversibles de desnaturalización para la CEP – modelo de Lumry-Eyring, con un primer paso de equilibrio rápido, y el modelo que incluye dos pasos irreversibles consecutivos, no mejoraron la bondad de los ajustes, lo que indica que el

modelo irreversible de dos estados es suficiente para describir cuantitativamente la cinética de la desnaturalización de CEP. Esta conclusión fue confirmada por nuestra investigación espectral sobre la desnaturalización térmica de esta enzima.

**Tabla 5.2. Parámetros estimados de la ecuación de Arrhenius para el modelo irreversible de dos estados en la desnaturalización de CEP a pH 3,0 (Zamorano *et al.*, 2009).** El coeficiente de correlación ( $r$ ) se calculó como:

$$r = \sqrt{1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_i^{\text{cal}})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - y_i^{\text{m}})^2}}$$

donde  $y_i$  e  $y_i^{\text{cal}}$  son respectivamente los valores experimentales y calculados de  $C_p^{\text{ex}}$ ;  $y_i^{\text{m}}$  es la media de los valores experimentales de  $C_p^{\text{ex}}$  y  $n$  es el número de puntos.

Parámetro	Temperatura de velocidad de barrido (K h <sup>-1</sup> )				Ajuste global
	29,7	45,5	59,3	87,5	
$\Delta H$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	119,4 ± 1,6	128,4 ± 1,9	130,2 ± 1,9	131,1 ± 2,1	
$T^*$ (K)	345,0 ± 0,1	344,8 ± 0,2	345,1 ± 0,1	344,8 ± 0,2	345,0 ± 0,2
$E_A$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	107,3 ± 1,2	103,9 ± 1,4	103,3 ± 1,3	104,8 ± 1,4	106,2 ± 1,6
$r$	0,9996	0,9995	0,9995	0,9992	0,9989

Está claro que el equilibrio termodinámico no se puede aplicar directamente a la desnaturalización de CEP a pH 3,0 porque es de naturaleza cinéticamente controlada. Sin embargo, es posible obtener datos termodinámicos útiles en la extrapolación de los parámetros de la transición a velocidad de calentamiento infinito (Privalov y Potekhin, 1986). Los parámetros termodinámicos obtenidos de este modo para la desnaturalización térmica de CEP a pH 3,0 se muestran en la Tabla 5.3. Si se tiene en cuenta que en el rango de pH ácido, los pares iónicos, que es conocido aportan estabilidad al contenido hemo de las peroxidetasas de clase III (Tams y Welinder, 1996), han desaparecido debido a la protonación, se puede suponer que el valor de la variación de energía libre para CEP a pH neutro puede ser más alto en 10-5 kcal mol<sup>-1</sup> (Zamorano *et al.*, 2008; 2009), demostrando que la enzima es extremadamente estable.

**Tabla 5.3 Parámetros termodinámicos para la desnaturalización de CEP a pH 3,0 (Zamorano et al., 2009).** El desviación estándar para los valores de  $T_m$  y  $T_{1/2}$  es  $\pm 0,2$  K; la entalpía de desnaturalización se determina por extrapolación de los parámetros de transición determinados experimentalmente para una velocidad de calentamiento infinita con una desviación estándar de  $\pm 0,5\%$ ;  $T_0$  es el valor de la temperatura a la cual el cambio de energía libre estándar  $\Delta G^\circ(T) = \Delta H(T_{1/2})(1 - T/T_0) - \Delta C_p[(T_0 - T) + T \ln(T/T_0)] = 0$  y  $\Delta C_p = 2,4 \pm 0,3$  kcal K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> se obtuvo por diferencia entre la capacidad calorífica de los estados nativo y desnaturalizado de la proteína en el punto medio de la transición.  $T_s$  es la temperatura del máximo de estabilidad.

$T_m$ (°C)	$T_{1/2}$ (°C)	$T_0$ (°C)	$\Delta H(T_m)$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$T_s$ (°C)	$\Delta G^\circ(T_s)$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
71,8	70,4	80,7	131,2	21,7	13,6

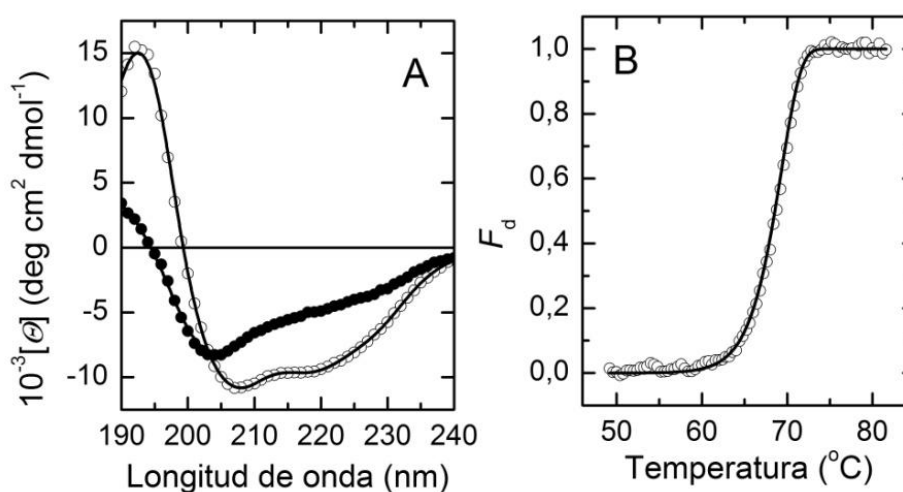
### 5.3.3. EXPERIMENTOS DE DICROISMO CIRCULAR

Los espectros de dicroísmo circular (CD) de CEP desnaturalizada e intacta a pH 3,0 se muestran en la Figura 5.9A. Un análisis de la estructura secundaria detallado del espectro CD se realizó usando el paquete de Software CDPro (Sreerama *et al.*, 1999). Los datos experimentales se trataron en un rango de 190-240 nm mediante tres tipos de software – SELCON3, CDSSTR, y CONTINLL- usando como referencia el SP43 (para las proteínas intactas) y SDP48 (para las proteínas desnaturalizadas). La menor desviación cuadrática media (RMSD) entre los valores experimentales y las curvas teóricas producidos por los programas con estas referencias se obtuvo con CDSSTR, y por ellos los resultados obtenidos con SELCON3 y CONTINLL se omitieron. Los resultados del análisis se dan en la Tabla 5.4. Los valores obtenidos para la CEP nativa son característicos para las diferentes hemo-peroxidasas (Banci, 1997). Se debe hacer notar que las estimaciones de  $\beta$ -lámina y giros  $\beta$  son generalmente peores que las estimaciones de  $\alpha$ -hélice porque la intensidad de los elementos de la estructura  $\beta$  son más bajos que los de la  $\alpha$ -hélice (Venyaminov y Yang, 1996).

**Tabla 5.4. Elementos de estructura secundaria (%) determinados por el análisis del espectro CD para la proteína nativa y desnaturalizada de CEP a pH 3,0. N, es la proteína ordenada, D es la distorsionada.**

Proteína	$\alpha$ -hélice			$\beta$ -lámina			Giro $\beta$	Desordenada
	N	D	Total	N	D	Total		
<b>Nativa</b>	20	18	38	0	7	7	22	33
<b>Desnaturalizada</b>	4	6	10	19	9	28	15	47

Cuando la proteína se desnaturaliza térmicamente, la forma del espectro de CEP cambia, apuntando a un incremento de la estructura desordenada, principalmente a expensas de la estructura de  $\alpha$ -hélice (ver Tabla 5.4). El incremento de la cantidad de  $\beta$ -lámina que también ocurre en la desnaturalización de CEP indica que la forma de la enzima apunta a una agregación proteica, probablemente de carácter intramolecular, al no haberse podido detectar un aumento de la turbidez en el proceso de desnaturalización.



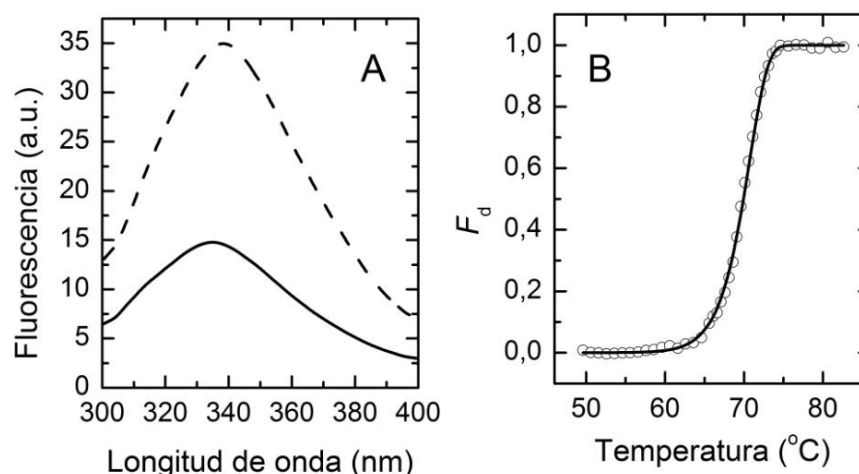
**Figura 5.9. Desnaturalización inducida térmicamente para CEP estudiada por espectroscopia óptica CD en el UV-lejano (Zamorano et al., 2009).** A. Espectro CD de UV-lejano para la CEP nativa a 25 °C (círculos abiertos) y térmicamente desnaturalizada a 80 °C (círculos cerrados) a pH 3,0 a una concentración de proteína de 10,2  $\mu$ M. Las líneas sólidas que atraviesan los símbolos son los mejores ajustes a los datos experimentales con el programa CDSSTR, usando SP43 para la proteína nativa y SDP para la proteína desnaturalizada. B. Fracción de proteína CEP desnaturalizada en función de la temperatura a pH 3,0, registrada por cambios de elipticidad molar a 222 nm, obtenidos con una velocidad de calentamiento constante de 60,3 K h<sup>-1</sup>. La línea continua representa la curva teórica del ajuste de los datos experimentales al modelo irreversible de dos estados (4.24).



La desnaturalización térmica de la CEP se siguió por cambios en la elipticidad molar a 222 nm, longitud de onda en la que los cambios son significativos cuando se produce la desnaturalización de la enzima. Con un incremento en la temperatura (Figura 5.9B), ocurre una transición cooperativa irreversible en el estado desnaturalizado, la cual se analizó usando el ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrado (línea a través de los puntos en la Figura 5.9B) (4.26), obteniéndose los valores de  $344,4 \pm 0,3$  K y  $103,2 \pm 1,7$  kcal mol<sup>-1</sup>, para la  $T^*$  y la  $E_A$ , respectivamente, los cuales son similares a los obtenidos por DSC (Tabla 5.2).

#### 5.3.4. EXPERIMENTOS DE FLUORESCENCIA

Los cambios en el entorno de los aminoácidos aromáticos se deben a cambios en la estructura terciaria de la proteína, los cuales pueden ser detectados por espectroscopia de su fluorescencia intrínseca. La Figura 5.10A muestra el espectro de fluorescencia de la proteína CEP en estado nativo (línea sólida) y térmicamente desnaturalizada (línea discontinua) a pH 3,0 y para una longitud de onda de excitación de 293 nm. La emisión de fluorescencia de CEP en estado nativo tiene un bajo rendimiento cuántico debido a la transferencia de energía al grupo hemo, que actúa de *quencher*. Cuando la proteína se desnaturaliza térmicamente se comprueba existe un aumento en la intensidad de fluorescencia (Figura 5.10<sup>a</sup>), que es debido a un cambio en la orientación relativa y/o alejamiento entre el grupo hemo y el triptófano, reduciendo el *quenching* (Hill *et al.*, 1986). Para la visualización de los resultados, se introdujeron cambios en la intensidad de fluorescencia para analizar el efecto de calor sobre la desnaturalización de CEP. Incrementando la temperatura (Figura 5.10B), ocurre una transición cooperativa irreversible al estado desnaturalizado, el cual se analiza por ajuste no lineal de mínimos cuadrados a la ecuación (4.26). Este ajuste (línea sólida en la Figura 5.10B) proporcionó los valores de  $T^*=343,9 \pm 0,4$ .K y  $E_A=102,9 \pm 2,3$ kcal mol<sup>-1</sup>, los cuales están de modo satisfactorio de acuerdo con los obtenidos por los experimentos DSC y CD.



**Figura 5.10. Desnaturalización térmicamente inducida de CEP seguida por espectroscopia óptica de fluorescencia (Zamorano *et al.*, 2009).** **A.** Espectro de fluorescencia de CEP nativa a 25 °C (línea sólida) y térmicamente desnaturalizada (línea discontinua) a pH 3,0 y concentración de proteína 179  $\mu$ M. La longitud de onda de excitación es de 296 nm. **B.** Fracción de proteína CEP desnaturalizada durante el proceso de desnaturalización térmica, registrada por medidas de intensidad de fluorescencia a 360 nm y pH 3,0. Se utiliza una velocidad de calentamiento de 96 K h<sup>-1</sup>. La línea continua es el mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación (4.26).

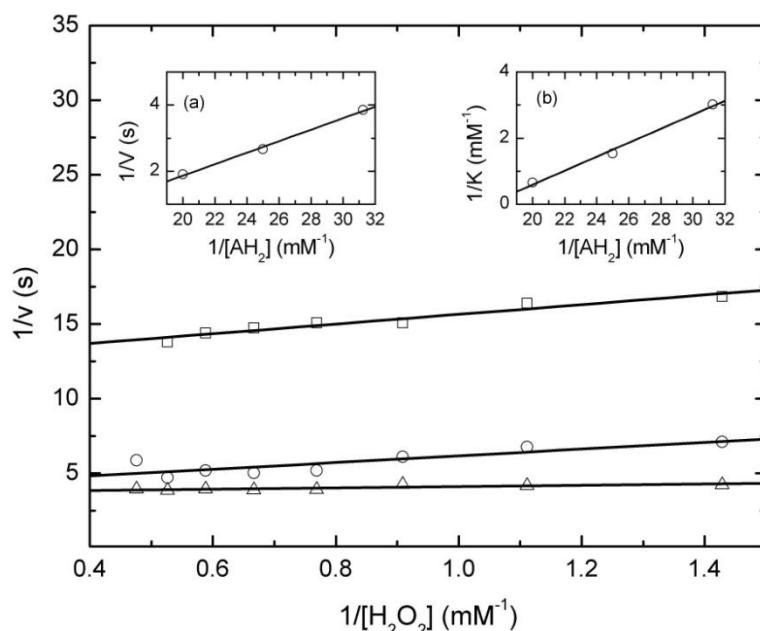
## 5.4. MECANISMO CATALÍTICO Y ESTUDIOS CINÉTICOS

### 5.4.1. ECUACIÓN DE VELOCIDAD DE ESTADO ESTACIONARIO Y PARAMETROS CINÉTICOS PARA LAS REACCIONES DE OXIDACIÓN CATALIZADAS POR CEP

En un sistema enzimático de dos sustratos, como es el caso, son posibles dos mecanismos generales para la interacción de los sustratos con la enzima: un mecanismo secuencial o un mecanismo ping-pong. En un mecanismo secuencial, ambos sustratos se combinan con la enzima para formar un complejo ternario antes de que ocurra la catálisis. Los sustratos se pueden combinar de forma aleatoria (Random Bi-Bi) o en un orden obligatorio (ordenada Bi-Bi) para formar el complejo ternario. Los productos formados a partir de la reacción por lo tanto, pueden ser liberados de forma ordenada o aleatoria. Sin embargo, en un mecanismo Ping Pong Bi-Bi el primer sustrato se combina con la enzima para formar un intermedio sustituido de la enzima. El segundo sustrato, que

interacciona con el intermedio de la enzima sustituida para formar el segundo producto, se regenera en la forma nativa de la enzima.

A pH 3,0 la representación de dobles recíprocos de velocidades iniciales de oxidación del ABTS frente a la concentración de peróxido de hidrógeno (0,1 a 2,1 mM) fijando constante la concentración de sustrato reductor ABTS, ofrece un conjunto de líneas aproximadamente paralelas, como se muestran en la Figura 5.11. Un comportamiento gráfico similar de los dobles recíprocos de los datos se obtuvo al estudiar el efecto de las concentraciones de ABTS sobre las velocidades iniciales de oxidación a diferentes concentraciones constantes de  $H_2O_2$  (datos no mostrados). Comportamientos similares a las líneas paralelas de los dobles recíprocos también se observaron a pH 7,0 para los sustratos reductores guayacol, o-dianisidina y o-fenilendiamina. Las tendencias lineales paralelas obtenidas en tales representaciones apuntan a un mecanismo Ping Pong involucrando dos formas independientes de la enzima (formas de la enzima separadas por etapa irreversible).



**Figura 5.11. Representación de dobles recíprocos de la velocidad inicial de la oxidación de ABTS como función de la concentración de peróxido de hidrógeno a concentraciones fijas de ABTS (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011a).** Las concentraciones de ABTS son 0,032 mM ( $\square$ ), 0,04 mM ( $\circ$ ), 0,05 mM ( $\Delta$ ). Los gráficos insertos en las figuras corresponden con las representaciones de  $1/V$  vs.  $1/[ABTS]$  (a) y de  $1/K$  vs.  $1/[ABTS]$  (b). Las disoluciones se llevaron a cabo a pH 3,0.

La representación de la intersección ( $1/V$ ) de las líneas anteriores y del inverso del parámetro  $K$  frente al recíproco de la concentración del sustrato fijo dan líneas rectas (intersecciones de la Figura 5.11 para el caso del ABTS). Los valores de  $K_m^{H_2O_2}$ ,  $K_m^{AH_2}$ ,  $V_{max}$  y  $k_{cat}$  se determinaron a partir de los correspondientes ajustes lineales de las ecuaciones (4.40; 4.41).

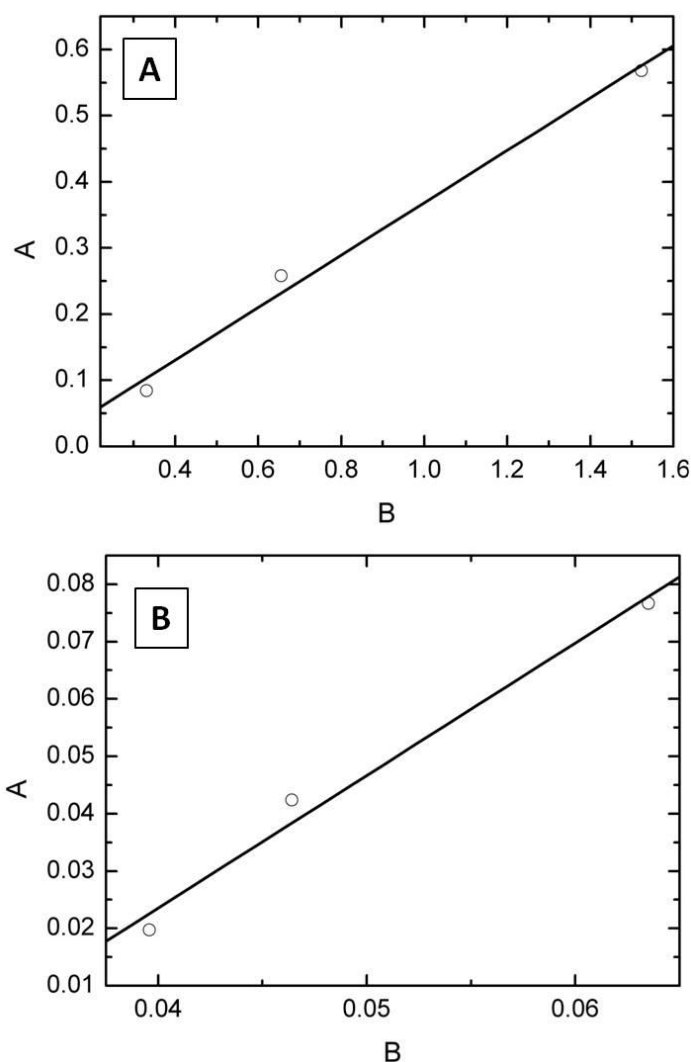
**Tabla 5.5. Parámetros cinéticos obtenidos para la oxidación mediada por el  $H_2O_2$  de los sustratos y catalizada por CEP (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011).** Todas las disoluciones de los sustratos se llevaron a cabo en tampón universal 20 mM, 25 °C, pH 7,0, excepto para el ABTS que fue a pH 3. La concentración de la enzima fue  $9,19 \cdot 10^{-8}$  M. La concentración fija para los sustratos empleados ABTS, Guayacol, o-dianisidina y o-fenilendiamina fueron 0,032, 18, 3,0, 2,0 mM, utilizando como medio de activación 1,12, 4,9, 0,1, 0,75 mM de  $H_2O_2$ , respectivamente.

Sustrato	$K_m^{H_2O_2}$ (M)	$K_m^{AH_2}$ (M)	$V_{max}$ (M s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m^{H_2O_2}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m^{AH_2}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
ABTS	$7,10 \cdot 10^{-5}$	$6,15 \cdot 10^{-4}$	$1,07 \cdot 10^{-4}$	$1,16 \cdot 10^3$	$1,63 \cdot 10^7$	$1,89 \cdot 10^6$
Guayacol	$3,58 \cdot 10^{-3}$	$9,25 \cdot 10^{-3}$	$8,39 \cdot 10^{-4}$	$9,13 \cdot 10^3$	$2,55 \cdot 10^6$	$9,87 \cdot 10^5$
o-dianisidina	$3,25 \cdot 10^{-3}$	$6,77 \cdot 10^{-3}$	$3,24 \cdot 10^{-4}$	$3,52 \cdot 10^3$	$1,05 \cdot 10^6$	$1,08 \cdot 10^6$
o-fenilendiamina	$9,26 \cdot 10^{-4}$	$3,03 \cdot 10^{-3}$	$5,06 \cdot 10^{-4}$	$5,51 \cdot 10^3$	$5,96 \cdot 10^6$	$1,82 \cdot 10^6$

El valor más alto para su constante catalítica  $k_{cat}$  y por lo tanto para su número de recambio fue con el sustrato guayacol, seguido de la o-fenilendiamina, la o-dianisidina y el ABTS. La mayor afinidad de la enzima ( $1/K_m$ ) fue para el ABTS, seguido de la o-fenilendiamina, la o-dianisidina y guayacol. Sin embargo la mayor constante de especificidad o eficacia catalítica de la enzima ( $k_{cat}/K_m$ ) se observó para el ABTS, seguido de la o-fenilendiamina, o-dianisidina y guayacol. Para los casos de las peroxidasas de palmera Africana (Sakharov *et al.*, 2002) y de palmera real (Watanabe *et al.*, 2010) se encontraron reactividades similares con estos sustratos.

### 5.4.2. CONSTANTES DE VELOCIDAD MICROSCÓPICAS

Para calcular las constantes microscópicas ( $k_1$  y  $k_3$ ) para la oxidación de sustratos por la acción de CEP, se ajustaron las velocidades de oxidación de los sustratos a cada concentración del sustrato reductor ( $AH_2$ ) y  $H_2O_2$ , asumiendo la aproximación del estado estacionario y considerando que  $k_2 > k_3$ . La representación de los dobles recíprocos ( $1/v$  vs.  $1/[H_2O_2]$ ) nos permite calcular los valores de A y B para cada una de las concentraciones de  $AH_2$ .



**Figura 5.12. Gráficos secundarios de los parámetros A (nmol s<sup>-1</sup>) vs. B (mM) obtenidos por la variación de las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011a). Las medidas se llevaron a cabo en tampón universal 20 mM a pH 3 y 25 °C A. Representación para tres concentraciones de ABTS 0,032, 0,04, 0,05 mM B. Representación para tres concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 1,2, 1,6, 2,1 mM.**

La Figura 5.12A muestra la representación de los valores de A frente a los de B (4.32) para las tres concentraciones de ABTS. De la línea recta obtenida es posible calcular el valor de  $k_1$  (constante de formación del compuesto I) para la oxidación del ABTS mediante la reacción catalizada por la peroxidasa CEP. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 5.6. Del mismo modo, se representan los dobles recíprocos ( $1/v$  vs.  $1/[AH_2]$ ) que nos permite calcular los valores de A y B para cada una de las concentraciones de  $H_2O_2$  para la reacción de oxidación del ABTS catalizada por CEP. La Figura 5.13B muestra la representación de A frente a B para tres concentraciones de  $H_2O_2$  en la oxidación del ABTS. De la línea recta obtenida es posible calcular el valor de  $k_3$  (constante de formación del compuesto II) para la reacción de oxidación de ABTS por la acción de CEP. El valor obtenido, al igual que para el resto de los sustratos estudiados, guayacol, o-dianisidina y o-fenilendiamina, se encuentra en la Tabla 5.6.

**Tabla 5.6. Valores de  $k_1$  ( $\mu M^{-1} s^{-1}$ ) y  $k_3$  ( $\mu M^{-1} s^{-1}$ ) a 25 °C para la oxidación mediada por  $H_2O_2$  de los sustratos por acción de CEP (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011a).**

Sustrato	$k_1$	$k_3$
ABTS	1,29	4,35
Guayacol	0,45	0,01
o-dianisidina	0,15	0,27
o-fenilendiamina	0,19	0,05

Estas representaciones de A frente a B permiten el cálculo de la verdadera constante de reacción,  $k_i$ , de las medidas de la velocidad de oxidación del estado estacionario, evitando la dependencia con la concentración del sustrato (Rasmussen *et al.*, 1995).

De los valores de la constante de velocidad,  $k_i$ , que se muestran en la Tabla 5.7, se puede deducir que CEP es capaz de oxidar sustratos fenólicos y aminas aromáticas. Los datos obtenidos muestran que el más reactivo de los sustratos para CEP fue el ABTS, seguido de las aminas aromáticas o-dianisidina y o-fenilendiamina, siendo el guayacol el sustrato menos reactivo. La alta reactividad del ABTS es debido al elevado número de átomos aceptores de enlaces de H, porque los valores más altos de las

constantes de reactividad son para sustratos con más átomos aceptores de enlaces de H ([www.chemicalregister.com](http://www.chemicalregister.com)). El ABTS tiene diez átomos aceptores de enlaces de H, la o-dianisidina cuatro, la o-fenilendiamina dos y el guayacol dos. En cuanto a los sitios dadores de enlaces de H -ABTS, o-dianisidina, o-fenilendiamina – cada uno tiene dos sitios dadores de enlace H donadoras y el guayacol sólo uno (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011a).

Estudios similares se han llevado a cabo determinando los parámetros cinéticos y las constantes microscópicas de peroxidasas de palma Africana (Sakharov *et al.*, 2002) y palma Real (Watanabe *et al.*, 2010) y revelan que estas enzimas presentan una mayor actividad frente al ácido ferúlico y ABTS, seguido de las aminas aromáticas o-dianisidina, o-fenilendiamina y, por último, los sustratos fenólicos con uno o dos grupos hidroxilo en sus estructuras químicas. Por el contrario, tanto la soja como el cacahuete poseen peroxidasas más reactivas con guayacol que con las aminas (Sakharov *et al.*, 2002; Gazaryan *et al.*, 1996). Se ha informado que tanto la peroxidasa de rábano picante como la peroxidasa de tabaco poseen la misma reactividad para el guayacol y la o-dianisidina y de 10-15 veces menos reactiva que para la o-fenilendiamina (Zamorano, 2009).

Los estudios de especificidad por sustrato de peroxidasas se realizan generalmente con la presencia de un único sustrato, junto con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en la mezcla de reacción; es decir, sin ningún tipo de sustrato alternativo capaz de someterse a la misma reacción. Esto se debe a que la presencia de sustratos que compitan tiende a complicar el análisis sin dar mucha más información de la que se obtendría mediante el estudio de los sustratos por separado. Sin embargo, esto implica una diferencia importante entre la práctica experimental y las condiciones fisiológicas en las que las enzimas suelen existir. En este sentido, la mayoría de las enzimas no son del todo específicas para un solo sustrato y, a menudo, se debe de elegir entre varios que se encuentran disponibles de forma simultánea. Por lo tanto, para ser fisiológicamente significativa la especificidad enzimática se debe definir en términos de lo bien que la enzima puede discriminar entre los sustratos presentes en la misma mezcla de reacción. Esto no significa que no puede determinarse a partir

de los parámetros cinéticos de la enzima por sustratos por separado, pero significa que estos parámetros deben ser interpretados correctamente y no de manera ocasional (Cornish-Bowden, 1995).

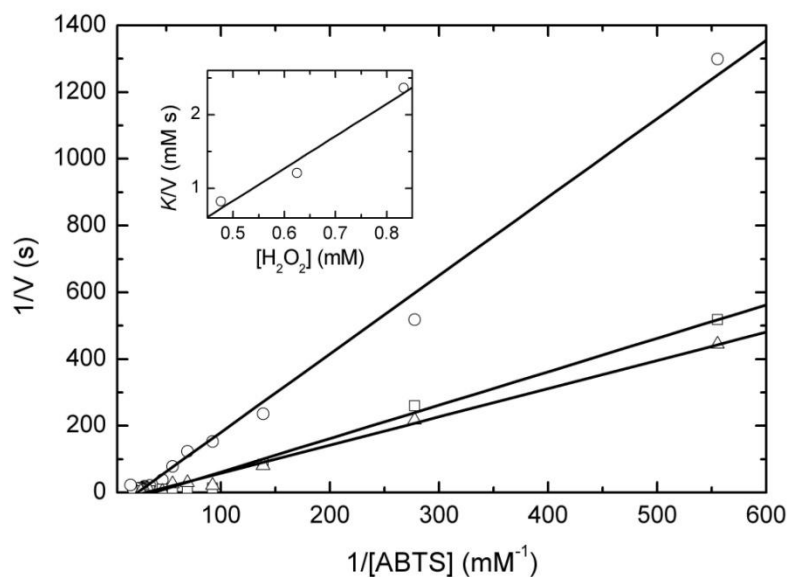
### 5.4.3. INHIBICIÓN POR SUSTRATO

Con el fin de verificar aún más el mecanismo cinético de las reacciones de oxidación por sustrato con CEP, se llevaron a cabo estudios de inhibición. Uno de los rasgos característicos de los mecanismos Ping-Pong es la existencia de inhibición competitiva por sustrato para ambos sustratos (Cleland, 1970).

En los mecanismos de reacción Ping-Pong, ya que las tres formas de la enzima – E (enzima en estado nativo), CoI (compuesto I) y CoII (compuesto II)- son tan similares, es razonable sospechar que AH<sub>2</sub> tiene alguna afinidad por E así como por CoI y CoII, y si los sitios activos en CoI y CoII no están demasiado ocupados para la adsorción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, también el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostrará algo de afinidad por CoI y CoII (Cleland, 1979). En las peroxidasas, se han comprobado la formación de un complejo no productivo o complejo *dead-end* entre el AH<sub>2</sub> y E y la reacción a altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con CoI aportando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> (Hiner *et al.*, 2004).

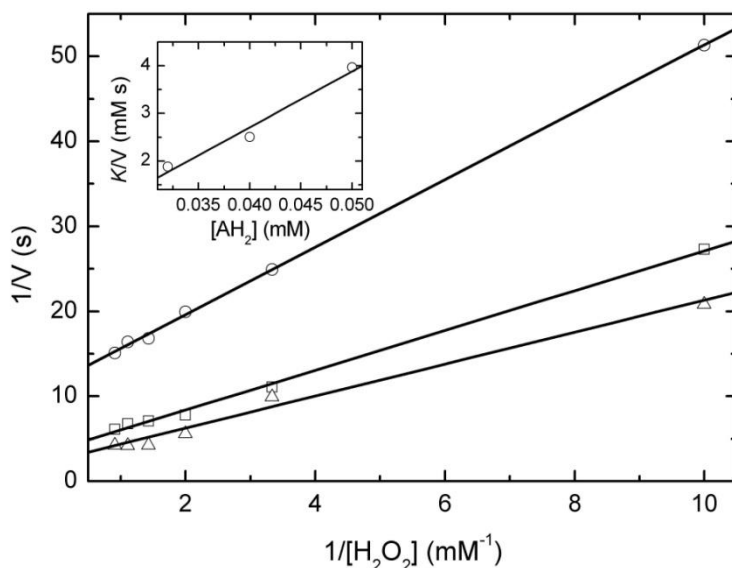
A partir de los dobles recíprocos de la ecuación (4.42), las representaciones de  $1/v$  vs.  $1/[H_2O_2]$  a concentración de sustrato AH<sub>2</sub> constante deberían de ser lineales cruzándose sobre el eje y. Este comportamiento gráfico se observa a concentraciones inhibitorias y fijas de ABTS (Figura 5.13). En este sentido, la Figura 5.13 muestra la representación lineal para el ABTS. Para los otros sustratos estudiados, se observa un comportamiento similar (datos nos mostrados).





**Figura 5.13. Representación primaria de los dobles recíprocos para las velocidades iniciales de oxidación del ABTS en función de la concentración de peróxido de hidrógeno a concentraciones inhibitorias fijas de ABTS (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011a).** Las concentraciones de ABTS fueron 1,1 ( $\circ$ ), 4,2 ( $\square$ ), 6,75 ( $\Delta$ ) mM. El cuadro interno muestra la representación secundaria de  $K/V$  frente a la concentración de ABTS.

Alternativamente, a valores fijos de concentración de  $H_2O_2$ , la representación de  $v$  frente a la concentración de  $AH_2$ , da lugar a una serie de ecuaciones que se han indicado en la sección de materiales y métodos.



**Figura 5.14. Representación primaria de los dobles recíprocos para las velocidades iniciales de oxidación del ABTS en función de la concentración de ABTS a concentraciones inhibitorias fijas de peróxido de hidrógeno (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011a).** Las concentraciones de  $H_2O_2$  fueron 0,032 ( $\circ$ ), 0,4 ( $\square$ ), 0,5 ( $\Delta$ ) mM. El cuadro interno muestra la representación secundaria de  $K/V$  frente a la concentración de  $H_2O_2$ .

En consecuencia, las correspondientes representaciones de  $1/v$  vs.  $1/[AH_2]$  son también lineales e intersectan en el eje  $y$  y las representaciones de  $K/V$  vs.  $[H_2O_2]$  deberían ser también lineales. Este comportamiento gráfico se obtiene para el ABTS a concentraciones fijas de  $H_2O_2$  (Figura 5.14) y también para el resto de los sustratos estudiados.

Se comprobó inhibición competitiva por sustrato para las reacciones de oxidación mediada por  $H_2O_2$  de ambos sustratos y catalizadas por CEP, como era de esperar para un mecanismo Ping-Pong. Las correspondientes constantes de inhibición obtenidas,  $K_{SI}^{H_2O_2}$  y  $K_{SI}^{AH_2}$ , para los sustratos estudiados se muestran en la Tabla 5.7.

**Tabla 5.7. Constantes de inhibición competitiva por sustrato (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011a).** Las concentraciones de ABTS, guayacol, o-dianisidina y o-fenilendiamina fijas empleadas fueron 0,032, 18, 3,0, 2,0 mM, respectivamente con una concentración de  $H_2O_2$  fija para cada sustrato de 1,2, 4,9, 0,1, 0,75 mM, respectivamente. Los rangos de concentraciones variables para cada uno de los sustratos siguiendo el mismo orden serían, 40-500, 30-500, 30-200, 30-200 mM de  $H_2O_2$ . El pH de trabajo fue 7,0 para todos los sustratos excepto para el ABTS que fue pH 3, y la temperatura 25 °C.

Sustrato	$K_{SI}^{H_2O_2}$ (M)	$K_{SI}^{AH_2}$ (M)
ABTS	$7,71 \cdot 10^{-4}$	$6,56 \cdot 10^{-8}$
Guayacol	$4,39 \cdot 10^{-3}$	$1,31 \cdot 10^{-3}$
o-dianisidina	$3,77 \cdot 10^{-4}$	$2,13 \cdot 10^{-3}$
o-fenilendiamina	$8,78 \cdot 10^{-3}$	$4,56 \cdot 10^{-4}$

Por lo tanto, los resultados combinados de velocidad inicial de reacción y de inhibición por sustrato excluyen un mecanismo secuencial ordenado o al azar, y solo son compatibles con un mecanismo Ping-Pong Bi-Bi, según la notación de Cleland (1970), como modelo cinético mínimo para las reacciones de oxidación de sustratos mediadas por  $H_2O_2$  y catalizadas por la peroxidasa CEP,.

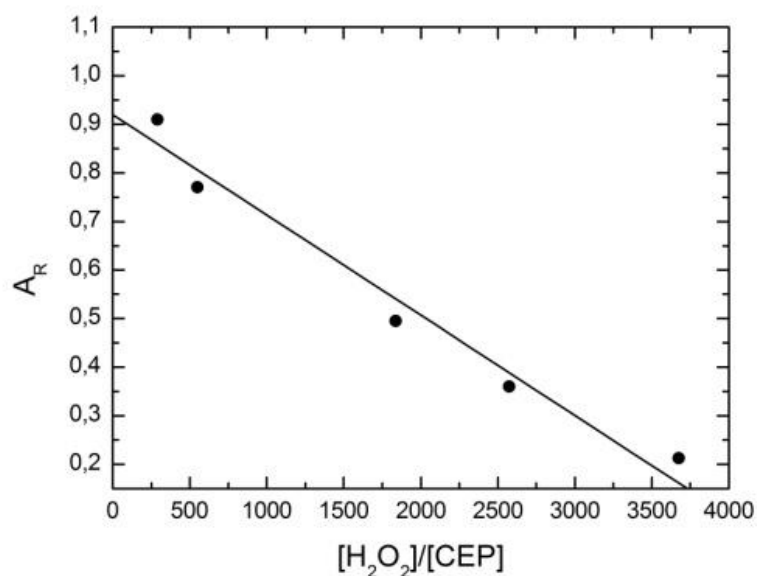
También se han comprobado cinéticas Ping-Pong para otras oxidaciones catalizadas por peroxidasa y mediadas por el CoI. Los resultados de los estudios de velocidad inicial de oxidación mediada por peróxido de hidrógeno del guayacol catalizada por la peroxidasa de nabo (Hosoya, 1960), del ferrocitocromo c catalizada por la peroxidasa de

rábano (HRP) (Santimone, 1975) y por la peroxidasa citocromo c (Yonetani y Ray, 1966) son consistentes con un mecanismo Ping-Pong. Los estudios de velocidad inicial de oxidación del ferrocitocromo c por la citocromo c peroxidasa de *Pseudomonas aeruginosa* produjeron intersecciones en las representaciones que fueron inicialmente interpretadas como indicación de un mecanismo de reacción secuencial (Ronnberg y Ellfolk, 1975). Sin embargo estudios posteriores demostraron que las intersecciones de las representaciones surgieron de la formación de un complejo inactivo enzima-peróxido de hidrógeno, y el mecanismo de la reacción fue reinterpretado como una modificación de un mecanismo Ping-Pong (Ronnberg *et al.*, 1981). Recientemente, se ha encontrado que la peroxidasa de palmera real también exhibe un mecanismo Ping-Pong Bi-Bi en las reacciones de oxidación de sustratos tales como guayacol, o-dianisidina, o-fenilendiamina, ácido ferúlico y catecol catalizadas con la mediación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zamorano, 2009).

#### **5.4.4. INACTIVACIÓN POR SUSTRATO SUICIDA**

##### **5.4.4.1. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN (r) PARA LA INACTIVACIÓN DE CEP POR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.**

Según la ecuación (4.45), representando los porcentajes de actividad peroxidasa residual para cada sustrato frente a la relación [peróxido]/[enzima], se puede obtener a partir del ajuste de regresión lineal de los datos y más concretamente de la intersección de la recta de ajuste con el eje x la relación requerida en cada caso para un 100% de inactivación se puede.



**Figura 5.15. Sensibilidad a la inactivación de la CEP a diferentes relaciones  $[H_2O_2]/[CEP]$**  (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011b). CEP se incubó con exceso de concentración de  $H_2O_2$  en tampón universal 10 mM, pH 3,0. Cuando se completa la reacción, a las 18-24 h de incubación, el porcentaje de actividad residual se midió con ABTS y otros sustratos.

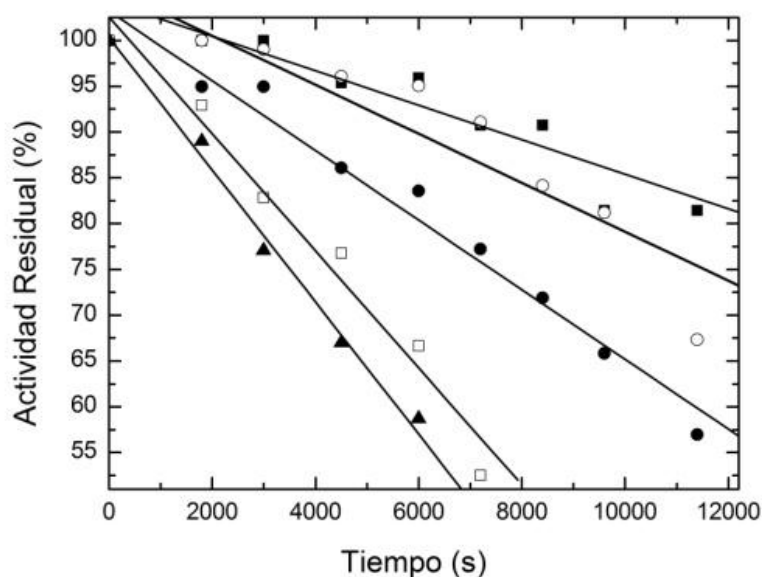
La Figura 5.15 muestra la representación del porcentaje de actividad residual frente a la relación  $[H_2O_2]/[CEP]$  para el sustrato ABTS, comportamiento que es representativo de los resultados obtenidos para los diferentes sustratos estudiados. Teniendo en cuenta que se consumen dos moléculas de  $H_2O_2$  en cada ciclo catalítico, una para la formación del CoI y otra para la inactivación o la catálisis, los valores de  $r$  calculados a partir de estas representaciones se muestran en la Tabla 5.8.

**Tabla 5.8. Constantes cinéticas aparentes calculadas para la inactivación de la peroxidasa CEP por  $H_2O_2$**  (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011b).  $r$ , es el número de recambio;  $k_{inact}^{app}$ , la constante de velocidad de inactivación;  $K_I^{app}$ , la constante de disociación del complejo  $[CoI-H_2O_2]$ ;  $1/K_I^{app}$ , la constante de afinidad de la enzima y el  $H_2O_2$ ;  $k_{cat}^{app}/K_I^{app}$ , la eficiencia de catálisis y  $k_{inact}^{app}/K_I^{app}$ , la eficiencia de la inactivación.

	$r$	$k_{inact}^{app}$ ( $s^{-1}$ )	$K_I^{app}$ (mM)	$1/K_I^{app}$ ( $M^{-1}$ )	$k_{cat}^{app}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}^{app}/K_I^{app}$ ( $s^{-1} M^{-1}$ )	$k_{inact}^{app}/K_I^{app}$ ( $s^{-1} M^{-1}$ )
ABTS	4844	3,24	845	1,18	15694	18573	3,83
Guayacol	3711	3,85	204	4,90	14287	70034	18,87
o-dianisidina	951	1,27	39,6	25,2	1209	30530	32,07
o-fenilendiamina	2147	1,79	87,1	11,5	3839	44076	20,55

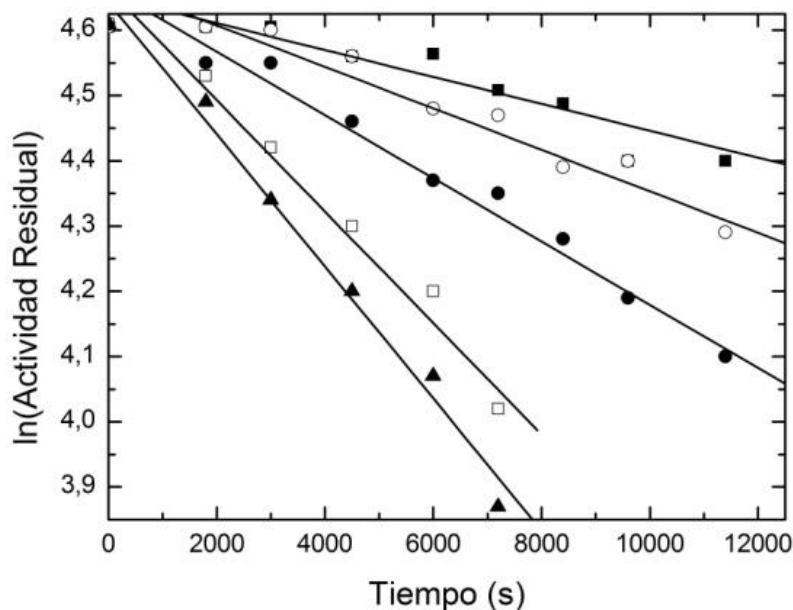
#### 5.4.4.2. CINÉTICA DE INACTIVACIÓN POR EL PEROXIDO DE HIDRÓGENO

La inactivación de la enzima por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en un rango de diferentes concentraciones se siguió a lo largo del tiempo (los resultados para el ABTS se muestran en la Figura 5.16)



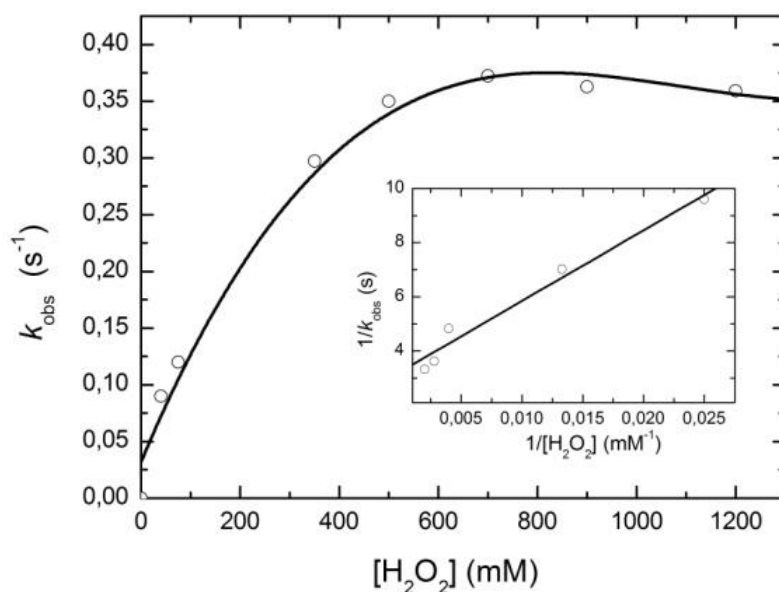
**Figura 5.16. Cinéticas de inactivación de la CEP por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011b).** La CEP (136 nM) se incubó con  $\text{H}_2\text{O}_2$  a concentraciones de 40 (■), 75 (○), 250 (●), 350 (□), 500 (▲) mM.

Al representar los logaritmos de los porcentajes de la actividad peroxidasa residual frente al tiempo, se obtienen líneas de regresión rectas (Figura 5.17) que permiten el cálculo mediante su ajuste de la constante de inactivación,  $k_{\text{obs}}$ . La inactivación de CEP por  $\text{H}_2\text{O}_2$  muestra una cinética de saturación, como se puede observar en el ajuste de los datos a una hipérbola de saturación al representar  $k_{\text{obs}}$  frente a la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 5.18).



**Figura 5.17. Representación semilogarítmica y los correspondientes ajustes de regresión lineal de los porcentajes de actividad residual en función del tiempo a diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011b).** La inactivación de CEP se siguió a lo largo del tiempo. CEP (136 nM) se incubó con  $H_2O_2$  a concentraciones de 40 (■), 75 (○), 250 (●), 350 (□), 500 (▲) mM.

La inactivación de la CEP, a diferencia de la inactivación de HRP (Arnao *et al.*, 1990; Hiner *et al.*, 1995; Hiner *et al.*, 1996) y de la peroxidasa de palma real (Zamorano 2009) con  $H_2O_2$  para diferentes sustratos, exhibe una cinética en una sola fase y no una cinética bifásica (una cinética rápida y corta seguida de una cinética lenta y prolongada en el tiempo).



**Figura 5.18. Curva cinética de inactivación (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011b).** Representación directa y de los dobles recíprocos (gráfico inserto) de  $k_{obs}$  (constante de inactivación de primer orden) frente a las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Las representaciones de dobles recíprocos de velocidad frente a concentración de inhibidor se utilizan con frecuencia como herramientas para examinar la formación de complejos entre el inhibidor y la enzima (Bayton *et al.*, 1994). Las constantes cinéticas aparentes calculadas de la enzima se presentan en la Tabla 5.8.

En ausencia de sustratos reductores y en alta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el CEP se inactiva con el tiempo en un proceso que depende de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, exhibiendo una cinética de inactivación suicida basada en un mecanismo de inactivación. Un comportamiento similar ha sido observado por otros autores (Arnao *et al.*, 1990; Hiner *et al.*, 1995; Hiner *et al.*, 1996; Bayton *et al.*, 1994) en estudios de inactivación enzimática mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en similares condiciones experimentales de temperatura, pH, y concentraciones de enzima y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo existen diferencias en los perfiles de las curvas de inactivación, en las magnitudes de las velocidades de inactivación a concentraciones específicas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y en la velocidad máxima de inactivación  $k_{intact}^{app}$  en comparación con los resultados presentados en este estudio.

El proceso de inactivación (Figura 5.17 y Tabla 5.8) implica la participación de dos vías: una reversible y otra irreversible, que pueden o no funcionar independientemente una de otra y cuya contribución individual al proceso global de inactivación parece depender de la concentración de  $H_2O_2$ . Para la inactivación de la enzima se requiere una segunda molécula de peróxido de hidrógeno, no para la inactivación en sí misma sino para la formación del Compuesto III. Una vez formado el Compuesto III, un porcentaje de su población se transformarían en otra especie no activa. Una interpretación alternativa sería que una vez la molécula de Compuesto III se ha formado, tendría cierta probabilidad de decaer en una especie no activa frente a decaer en una especie activa que entraría de nuevo al ciclo catalítico (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011).

Varios autores (Arnao *et al.*, 1990; Hiner *et al.*, 1995; Hiner *et al.*, 1996) han propuesto la existencia de una partición entre de las dos vías para el compuesto I. Su modelo, basado en estudios a altas concentraciones de  $H_2O_2$ , invoca una partición adicional entre estas dos vías de inactivación y sugiere la existencia de una reacción catalítica en la que el  $H_2O_2$  se consume causando relativamente poco daño sobre la enzima (Bayton *et al.*, 1994).

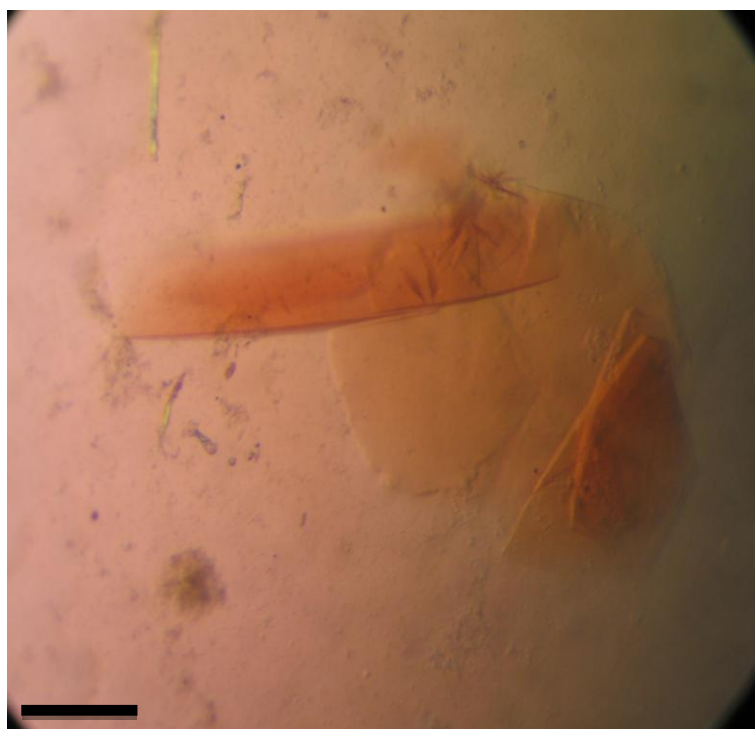
La accesibilidad del sustrato al sitio reductor de unión en el grupo hemo y su afinidad por el producto son factores importantes para la actividad enzimática, como se observó para la o-dianisidina. La especificidad por sustrato se puede alterar por cambios que afecten al sitio reductor de unión (Smith *et al.*, 1992) y puede ser posible ajustar aún más la especificidad y el nivel de actividad de la CEP por cambios apropiados en esta región.

La glicosilación de CEP parece ser importante en la protección de la enzima de la inactivación para los diferentes sustratos. Sin embargo, la CEP es la más activa de todas las peroxidases actualmente conocidas, lo que sugiere que el centro activo de la enzima ha evolucionado no sólo para mejorar la eficiencia catalítica sino también para impedir la inactivación por el altamente reactivo sustrato  $H_2O_2$  (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011b).



## 5.5. CRISTALIZACIÓN Y ESTUDIOS PRELIMINARES CRISTALOGRÁFICOS DE LA PEROXIDASA *Chamaerops Excelsa*

Se han logrado varios éxitos de cristalización de la enzima probando más de 800 condiciones de detección diferentes. Sin embargo, sólo en condiciones que suponían un depósito de sulfato de amonio se pudieron producir cristales con propiedades de difracción de rayos X. En este sentido, se obtuvieron cristales de buen tamaño con sulfato amónico 1,7 M en 0,085 M Tris, pH 8,0, 17% PEG MME 2000 y 15% de glicerol, y a pesar de su delgada morfología (Figura 5.19), estos cristales fueron adecuados para la recogida de datos por difracción de rayos-X.



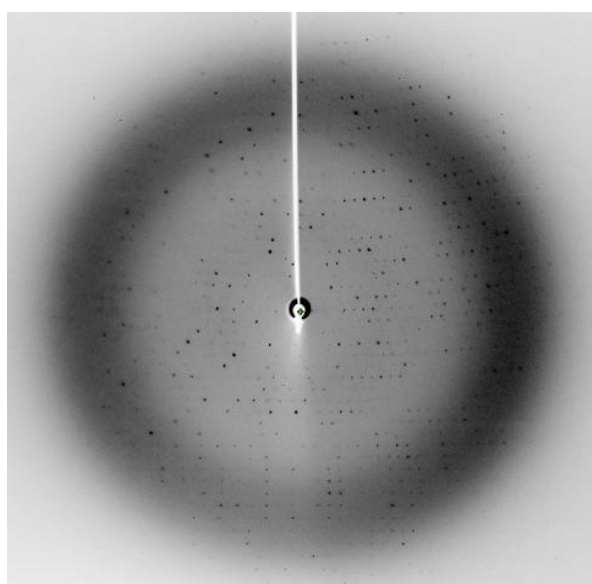
**Figura 5.19. Cristales de CEP.** El crecimiento de los cristales se llevó a cabo en tampón sulfato amónico 1.7 M, Tris 0,085 M, pH 8,0, PEG MME 2000 17% y glicerol 15% , usando como técnica la difusión de la gota colgante. La línea negra equivale a 100  $\mu\text{m}$ .

El conjunto de datos completo de la proteína nativa se recogió sobre una línea de luz MX2 (LNLS, Brasil) con una resolución de 2,6 Å (Figura 5.20). El análisis de datos clasifica a los cristales de CEP dentro del sistema ortorrómbico con grupo espacial  $P2_12_12_1$  y con unos parámetros

de celda  $a = 70,2 \text{ \AA}$ ,  $b = 100,7 \text{ \AA}$ ,  $c = 132,3 \text{ \AA}$ . De acuerdo con el coeficiente  $2,11 \text{ \AA}^3\text{Da}^{-1}$  de Matthews (Matthews, 1968), el contenido de solvente del cristal es del 42%, considerando dos moléculas en la unidad asimétrica (Textor *et al.*, 2011). Los datos recogidos y su procesamiento estadístico están recogidos en la Tabla 5.9.

**Tabla 5.9. Parámetros estadísticos del análisis de difracción preliminar de los cristales de CEP (Textor *et al.*, 2011).** Los resultados entre paréntesis corresponden al nivel de más alta resolución.  $\dagger R_{\text{merge}} = \sum |I_j - \langle I \rangle| / \sum \langle I_j \rangle$ , donde  $I_j$  es la intensidad observada de la reflexión individual y  $\langle I \rangle$  es el promedio de la intensidad de reflexión.

Parámetro de difracción de rayos X	Datos obtenidos por difracción de rayos X para CEP
Línea de luz	MX2-LNLS
Longitud de onda (Å)	1,46
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Parámetros de la celda unidad (Å)	$a = 70,2$ , $b = 100,7$ , $c = 132,3$
Rango de resolución (Å)	80,1-2,6 (2,7-2,6)
Número de reflexiones únicas	29525 (5779)
Multiplicidad	4,3 (4,3)
Integridad (%)	90,1 (91,8)
$R_{\text{merge}}^\dagger$ (%)	10,1 (55,3)
$I/\sigma I$ (I)	10,4 (3,7)



**Figura 5.20. Mapa de difracción de rayos X de los cristales de CEP (Textor *et al.*, 2011).** La resolución máxima es de 2,6 Å.

La determinación de la estructura de CEP se llevó a cabo por sustitución molecular usando como modelo de búsqueda la estructura de la peroxidasa de palma real *Roystonea regia* (PDP code 1hdl, Watanabe *et al.*, 2010). Para ello, el modelo de búsqueda fue manipulado de manera que los hidratos de carbono unidos covalentemente, el grupo hemo y los átomos no enlazados no se consideran en la búsqueda durante la rotación y la traslación. Se obtuvo una única solución con obtención de LL de 1193 y una puntuación de Z de 46 en la unidad asimétrica. Además en la inspección de la densidad electrónica, los ciclos iniciales del cuerpo rígido y el refinamiento han permitido la solución primaria con un factor R de 36,5%, R libre de 34,8% y la figura de mérito (FOM) de 0,6, valores de 28,6%, 32,8% y 0,66, respectivamente, lo cual indica que son buenos para la determinación en solución. La construcción de modelos de refinamiento para la identificación de las uniones N-glicosiladas y los centros de calcio se encuentra actualmente en estudio (Textor *et al.*, 2011).

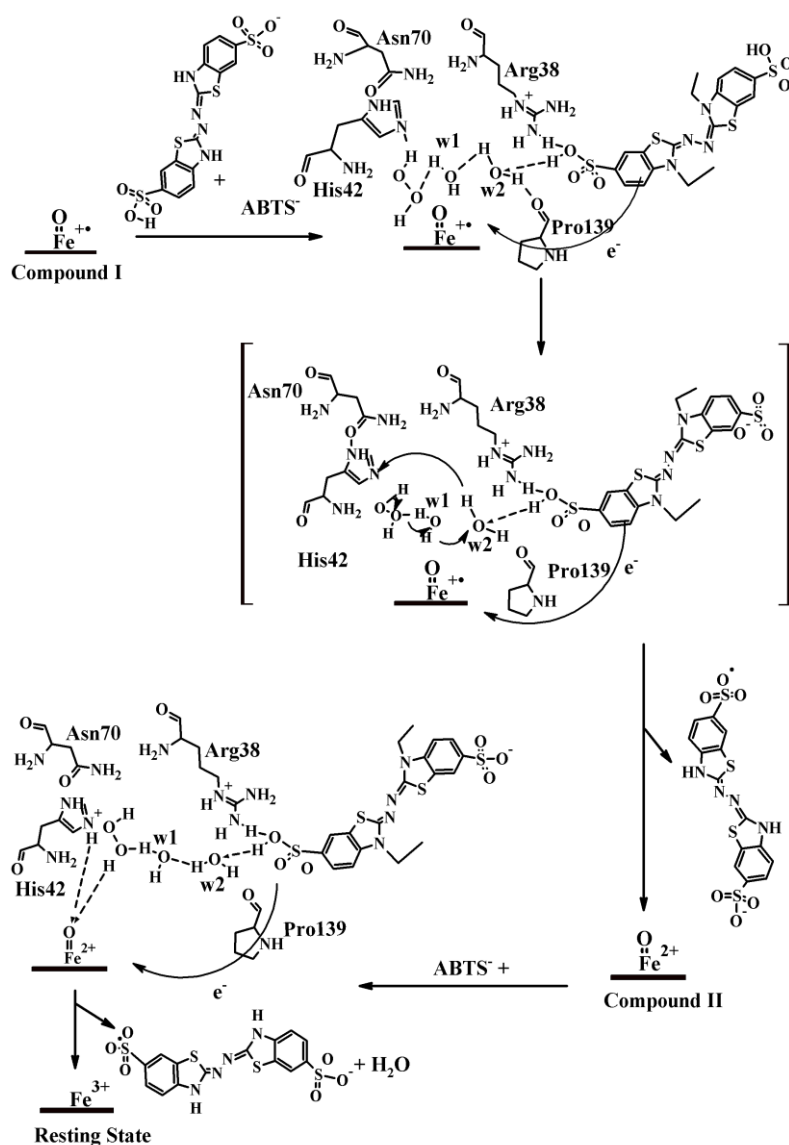
## 5.6. SITIOS DE INTERACCIÓN DEL SUSTRATO EN LA REDUCCIÓN DE LOS COMPUESTOS I Y II

Se ha estudiado el poder oxidante del alto nivel oxidación del estado intermedio de las peroxidasas de plantas por medidas de sus potenciales redox. En el caso de la HRP-C, los potenciales redox de ambos compuestos CoI y CoII se han determinado son muy próximos a +1 V a pH cercanos a la neutralidad (Hayashi y Yamakazi, 1979). Esta demostración de que los potenciales de ambas parejas redox eran similares fue un resultado importante, ya que se había pensado previamente que el CoI, más reactivo, sería necesariamente un oxidante más fuerte que el CoII. Las diferencias de reactividad entre CoI y CoII pueden ser interpretadas en los términos de la teoría de Marcus de transferencia electrónica, donde la distancia relativa entre el sustrato reductor y el más alto estado intermediario de oxidación es un factor crítico (Folkes y Candeias, 1997).

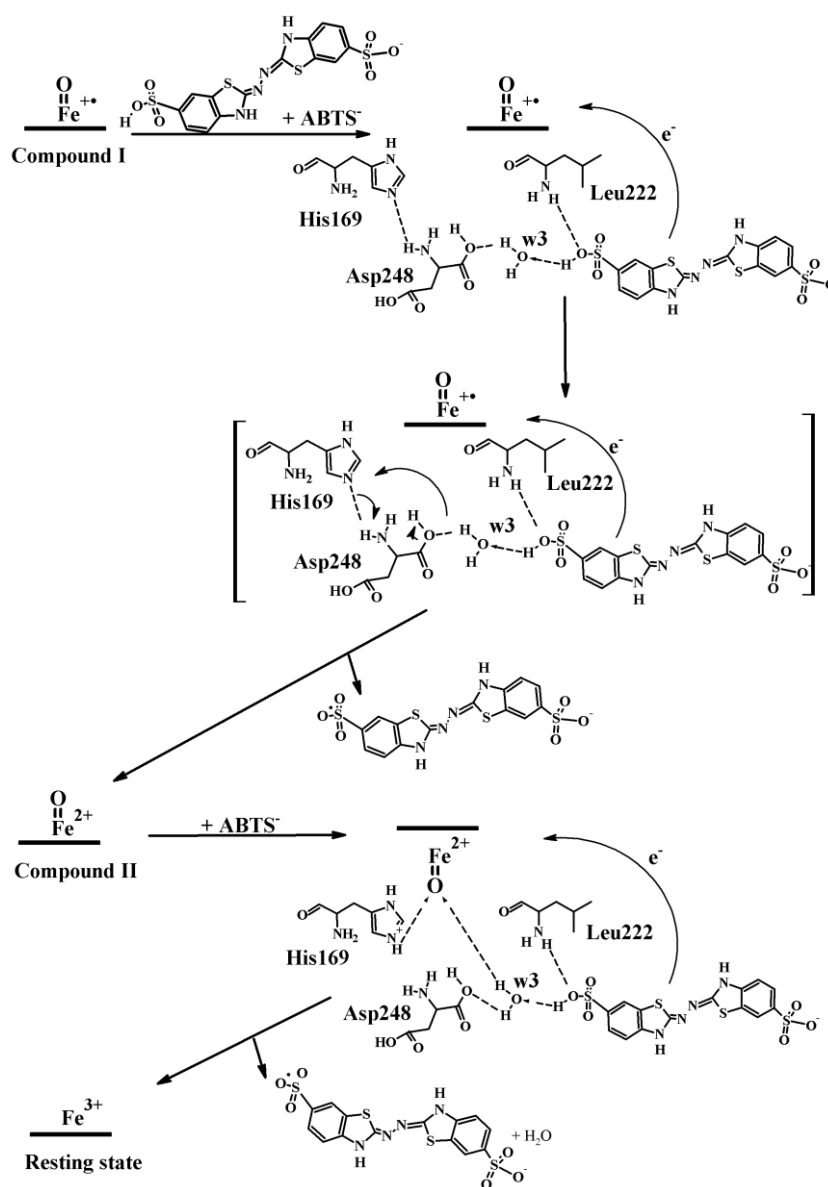
Es evidente que la distancia de transferencia electrónica desde la reducción de sustrato para el  $\pi$ -catión radical de la porfirina del CoI es menor que la del átomo de hierro hemo oxoferril del CoII (Veitch, 2004). Se deduce, pues que accederle acceso de un sustrato voluminoso al sitio de interacción está limitado pudiendo mostrar una baja reactividad sobre el centro activo debido al incremento de la distancia de transferencia electrónica. En los casos donde la distancia de transferencia electrónica se asume como constante, por ejemplo en las series estructurales parecidas de los derivados del fenol o del indol que acceden al mismo sitio de interacción del sustrato, la velocidad de reducción de CoI se correlaciona bien con los potenciales de los productos radicálicos (Candeias *et al.*, 1997).

Estudios preliminares sobre la peroxidasa de palma CEP revelan que la composición del centro activo de la enzima es la característica de las peroxidasas de Clase III (descrito en la introducción bibliográfica), y más concretamente igual que la de la peroxidasa de palma real (RPTP) estudiado por nuestro grupo (Watanabe *et al.*, 2010). Por ello, podemos inferir que existe un lado distal y un lado proximal constituido por el mismo tipo de átomos.

Teniendo en cuenta la composición del centro activo, el funcionamiento del mecanismo del ciclo catalítico de las peroxidasas y el acceso al centro activo por parte de los sustratos, proponemos un mecanismo explicativo del ciclo de la peroxidasa de palma (Figuras 5.21 y 5.22), en el cual la descomposición del peróxido de hidrógeno se logra a través de la división heterolítica de  $H_2O_2$  para formar una molécula de agua. El ciclo se presenta para el sustrato ABTS, que es el que presenta mayor afinidad por la enzima.



**Figura 5.21. Mecanismo del lado distal (Hidalgo Cuadrado et al., 2011c).** En base a que el compuesto Col (formado a través del mecanismo de Poulos y Kraut) está en el lado distal y teniendo en cuenta los enlaces contenidos en la estructura, el sustrato (ABTS) entrará a través de la segunda molécula de agua ( $w_2$ ), cediendo protones a  $w_2$  (que se estabiliza por la Pro139 y el hidrógeno de la molécula de agua  $w_1$ ). Además, el sustrato se estabiliza por puentes de hidrógeno formados entre la Arg38 conservada en la parte distal, lo que dará un electrón en un proceso redox característico de las peroxidasa de Clase III. Se producirá una reacción intermedia, que se traducirá en un reordenamiento sigmatrópico de H pertenecientes a la molécula de  $w_2$ , que luego serán transferidos al anillo imidazol de la His42, por lo que se puede acidificar. Por lo tanto, la molécula de agua  $w_2$  acepta el hidrógeno de la molécula de sustrato y permite que este hidrógeno se aproxime en forma de radical (como se muestra en los mecanismos propuestos para las peroxidasa de Clase III), lo que conduce a la formación del denominado compuesto ColI. Luego, otra molécula de ABTS (en el mismo lado) entra a través de una reordenamiento de H que permitirá que el H ácido del anillo imidazol de His42 esté como producto oxigenado en el hierro del centro activo, regenerándose así el hierro en su estado de oxidación inicial y la formación de una molécula de agua y otra molécula del sustrato en forma radical.



**Figura 5.22. Mecanismo en el lado proximal (Hidalgo Cuadrado et al., 2011c).** En el lado proximal ocurre un proceso análogo al que se produce en el lado distal. Aquí la molécula de sustrato, cuando entre, se estabiliza por puentes de hidrógeno con Leu222 y el grupo H-SO<sub>3</sub>H del ABTS, que será donado a la molécula de agua w3. Esta molécula de agua (w3) se estabiliza por puentes de hidrógeno con la Asp248, conservada en la estructura, por la formación de puentes de hidrógeno con el NH del lado proximal de la His169 y por un reordenamiento del H.



## **PARTE VI**

### **CONCLUSIONES**

*"Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto y pensar lo que nadie más ha pensado"*

*Albert Szent Györgi. 1927*





**A. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LA PEROXIDASA CEP**

- ✓ Al igual que el resto de las peroxidases, CEP presenta una masa molecular de  $54 \pm 3$  kDa característica de este tipo de enzimas, siendo por ejemplo,  $48 \pm 3$  kDa para RPTP.
- ✓ La CEP posee una única isoenzima ácida, con un pI de 6,8, siendo algo superior al de RPTP que es de 5,3.
- ✓ La CEP es una enzima dimérica en disolución
- ✓ Como cualquier peroxidasa de la superfamilia de plantas, la CEP presenta en su espectro un máximo de absorción a 403 nm (banda Soret), que tiene una intensidad tres veces superior a la de la banda 280 nm, y las bandas características  $\alpha$  y  $\beta$ , que aparecen a 485-490 y 630-635 nm, respectivamente.

**B. ESTABILIDAD DE LA PEROXIDASA CEP**

- ✓ La desnaturalización térmica de la CEP a pH 3,0 es un proceso irreversible controlado cinéticamente. Se registra por medidas de fluorescencia, dicroísmo circular y calorimetría diferencial de barrido, ajustándose el proceso, en todos los casos, a un modelo irreversible de desnaturalización simple de dos estados. Los parámetros cinéticos  $E_A$  y  $T^*$ , obtenidos por las tres metodologías, son:  $102,9 \pm 2,3$  kcal mol<sup>-1</sup> y  $343,9 \pm 0,4$  K (Fluorescencia),  $103,2 \pm 1,7$  kcal mol<sup>-1</sup> y  $344,4 \pm 0,3$  K (DC) y  $106,2 \pm 1,6$  kcal mol<sup>-1</sup> y  $345,0 \pm 0,2$  K (DSC). La extrapolación de estos datos, a velocidad de calentamiento infinita, permite determinar algunos parámetros termodinámicos del proceso de desnaturalización térmica a pH 3.0.
- ✓ El valor de la energía de activación para la CEP ( $105,1 \pm 1,7$  kcal mol<sup>-1</sup>) está muy próximo al de la AOPTP ( $103 \pm 6$  kcal mol<sup>-1</sup>) y es un poco menor que el de la RPTP ( $129,1 \pm 0,8$  kcal mol<sup>-1</sup>) y significativamente más alto que los de HRP-C ( $38,2 \pm 0,5$  kcal mol<sup>-1</sup>) y la aPrX ( $37,9 \pm 0,5$  kcal mol<sup>-1</sup>).

- ✓ Comparando los parámetros cinéticos de la estabilidad a pH 3,0 de la CEP con los correspondientes a otras peroxidases (Pina *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2002; Zamorano *et al.*, 2004; Zamorano *et al.*, 2008), es evidente la elevada termoestabilidad de la CEP, ya que es sustancialmente mayor que la de la isoenzima c de la peroxidasa de rábano picante (HRP-C), que la peroxidasa aniónica de cacahuete (aPrX), y prácticamente la misma que las de las peroxidases de palma africana *Elaeis guineensis* (AOPTP) y de palma real *Roystonea regia* (RPTP) (Zamorano *et al.*, 2009). Así pues, las peroxidases de hojas de palmeras tienen valores más altos de  $E_A$  y son estructuralmente y funcionalmente las peroxidases más estables, apuntando a su potencial uso en diferentes aplicaciones biotecnológicas (Zamorano *et al.*, 2009).

### C. ESTUDIOS CINÉTICOS DE LA PEROXIDASA DE PALMA CEP

- ✓ La peroxidasa de palma *Chamaerops excelsa*, CEP, en presencia de  $H_2O_2$ , oxida a un determinado número de sustratos orgánicos estudiados (ABTS, guayacol, o-dianisidina, o-fenilendiamina) siguiendo un mecanismo Ping-Pong Bi-Bi. En cuanto a su especificidad por sustratos, presenta mayor afinidad por los sustratos con más átomos aceptores de enlaces por puente de H, así tiene mayor afinidad para el sustrato ABTS que para el resto de los sustratos estudiados, debido a sus 10 átomos aceptores (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011a).
- ✓ En el caso de la inhibición competitiva comprobada para ambos sustratos, siempre es más rápida para el peróxido de hidrógeno que para el sustrato reductor ( $\sim 12000$  para ABTS,  $\sim 3$  para el guayacol,  $\sim 2$  para la o-dianisidina y  $\sim 20$  para la o-fenilendiamina más rápida para el peróxido que para el sustrato correspondiente).
- ✓ La cinética de inactivación de CEP por el peróxido de hidrógeno para la oxidación de los sustratos estudiados muestra el comportamiento clásico de inactivación suicida de la mayor parte de las peroxidases de su clase (Arnao *et al.*, 1990; Hiner *et al.*, 1995,

Hiner *et al.*, 2000; Hernández-Ruiz, *et al.*, 2001). A partir de los parámetros de inactivación, se puede observar la buena resistencia de la enzima a la inactivación para cualquiera de los sustratos utilizados a diferentes pH's. Además, se ha observado la alta capacidad de trabajo de la enzima a pH 3,0 con el ABTS, pH al que la mayoría de las enzimas no son capaces de funcionar catalíticamente, realizando un recambio de moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 4844 y una constante de inactivación de 15694 s<sup>-1</sup> (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011b).

- ✓ La cinética de inactivación de CEP por el peróxido de hidrógeno para la oxidación del resto de los sustratos estudiados fue seguida a pH 7,0, determinándose números de recambio de 3711, 951, 5147 y valores de la constante de velocidad de catálisis de 14287 s<sup>-1</sup>, 1209 s<sup>-1</sup>, 3839 s<sup>-1</sup> para el guayacol, o-dianisidina y o-fenilendiamina, respectivamente. Estos valores parecen indicar que la CEP presenta una notable resistencia frente a la inactivación por peróxido de hidrógeno, lo que abre una línea para estudios posteriores relacionados con los mecanismos de intercambio de peróxido de hidrógeno en las peroxidasas (Hidalgo Cuadrado *et al.*, 2011b).

#### D. ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LA CEP

- ✓ La CEP tiene una estructura secundaria en la que predominan las  $\alpha$ -hélices (38%) sobre las hojas  $\beta$  (7%) y las estructuras desordenadas (33%). Cuando la enzima se desnaturaliza térmicamente a pH 3,0, se reduce mucho el contenido de las  $\alpha$ -hélices (10%) a favor de las estructuras desordenadas (47%) y las hojas  $\beta$  (28%). El análisis de difracción revela la existencia de 15  $\alpha$ -hélices.

#### E. CRISTALOGRAFÍA DE LA CEP

- ✓ Los resultados experimentales indican que la CEP está fuertemente glicosilada, al igual que otras peroxidasas de Clase III. Sin embargo,

la calidad de los cristales que se obtuvieron en condiciones saturantes de sulfato amónico permitió conseguir los datos de difracción de rayos-X de la enzima nativa , que se obtuvieron con una resolución de 2,6 Å. Se encontró una solución de reemplazamiento y el análisis de la estructura está esperando a la construcción del modelo final y de refinamiento (Textor *et al.*, 2011).

#### **F. MECANISMO CATALITICO DE LA CEP**

- ✓ Estudios preliminares revelan que la composición del centro activo de la CEP es la característica de las peroxidasas de Clase III y más concretamente igual que la de RPTP descrita por nuestro grupo (Watanabe *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta la composición del centro activo, el ciclo catalítico de las peroxidasas y el acceso al centro activo por parte de los sustratos, se propone un mecanismo explicativo del ciclo catalítico de la peroxidasa CEP, en el cual la descomposición del peróxido de hidrógeno se logra a través de la división heterolítica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formar una molécula de agua.

## **PARTE VII**

### **BIBLIOGRAFÍA**

*Hay tres etapas en todo descubrimiento: primero, la gente rechaza lo que es verdad; luego niega que sea importante; finalmente, se atribuye el mérito a quien no le corresponde"*

*Alexander von Humboldt.*



Adak, S. & Banerjee, R.K. Haem propionates control oxidative and reductive activities of horseradish peroxidase by maintaining the correct orientation of the haem. *Biochem. J.* 15 (1998) 51-56.

Adediran, S.A., and Lambeir, A.M. kinetics of the reaction of compound II of horseradish peroxidase with hydrogen peroxide to form compound III. *Eur. J. Biochem.* 186 (1989) 571-576.

Adediran, S.A. Kinetics of the formation of p-670 and of decay of Compound III of horseradish peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 3247 (1996) 279-284.

Adler, P.R. Arora, R., El Ghaouth, A., & Glenn, D.M. Solar, bioremediation of phenolic compounds from water with plant root surface peroxidases, *J. Environ. Qual.* 23 (1994) 1113-1117.

Akkara, J.A., Senecal, K.J., & Kaplan, D.L. Synthesis and characterization of polymers produced by horseradish peroxidase in dioxane, *J. Polymer. Sci: Part A: Polymer. Chem.* 29 (1991) 1561-1574.

Alberty, R.A. A short history of the thermodynamics of enzyme-catalyzed reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953) 1921-1926.

Allen, J.D., Bentley, D., Stringer, R.A. & Lowther, N. Hybrid (BDBB) interferon-alpha: preformulation studies. *Int. J. Pharm.* 187 (1999) 259-272.

Alpeeva, I.S., Niculescu-Nistor, M., Leon, J.C., Csöregi, E., & Sakharov, I.Y. Palm tree peroxidase-based biosensor with unique characteristics for hydrogen peroxide monitoring. *Biosens. Bioelectron.* 21 (2005) 742-748.

Amisha Kamal, J.K., Behere, D.V. Thermal and conformational stability of seed coat soybean peroxidase. *Biochemistry* 41(29) (2002) 9034-9042.



Anderson, D.E., Becktel, W.J. & Dahlquist, F.W. pH-induced denaturation of proteins: a single salt bridge contributes 3-5 kcal/mol to the free energy folding of T4 Isozyme. *Biochemistry* 29 (1990) 2403-2408.

Anfisen, C.B., Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181 (1973) 223-230.

Anson, R.M. & Bohr, V.A. Mitochondria, oxidative DNA damage, and aging. *J. Am. Aging. Assoc.* 23 (2000) 199-218.

Arai, M., & Kuwajima, K. Role of the molten globule state in protein folding. *Adv. Protein Chem.*, 53 (2000) 209-282.

Arnao, M.B., Acosta, M., del Rio, J.A. & García-Cánovas, F. Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent. *Biochim. Biophys. Acta* 1038 (1990) 85-89.

Arseguel, D., & Babouléne, M. Removal of phenol from coupling of tale and peroxidase. Application for depollution of waste water containing phenolic compounds. *J. Chem. Technol.* 61 (1994) 331-335.

Banci, L. Structural properties of peroxidases, *J. Biotechnol.* 53 (1997) 253-263.

Barr, D.P., gunther, M.R., Deterding, L.J., Tomer, K.B. & Mason, R.P. ESR spin trapping of a protein-derived tyrosyl radical from the reaction of Cytochrome c with hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 15498-15503.

Barr, D.P. & Mason, R.P. Mechanism of radical production from the reaction of cytochrome c with organic hydroperoxides –an ESR spin-trapping investigation. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 12709-12716.

Bayton, K.J., Bewtra, J.K., Biswas, N. & Taylor, K.E. inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide: a kinetic investigation. *Biochim. Biophys. Acta* 1206 (1994) 272-278.

Bernards, M.A., Kristen Summerhurst, D. & Razem, F.A. Oxidases, peroxidases and hydrogen peroxide: The suberin connection. *Phytochem. Rev.* 3 (2004) 113-126.

Blodig, W., Smith, A.T., Doyle, W.A. & Piontek, K. Crystal structure of pristine and oxidatively processed lignin peroxidase expressed in *Escherichia coli* and of the W171F variant that eliminates the redox active tryptophan 171. Implications for the reaction mechanism. *J. Mol. Biol.* 305 (2001) 851-861.

Brown, S.B. A model for the formation of bile-pigments isomers *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. J.* 159 (1976) 23-27.

Cai, D.Y. & Tien, M. On the reactions of lignin peroxidase compound III (isoenzyme H8). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 162 (1989) 464-469

Caramyshev, A.V., Evtushenko, E.G., Ivanov, V.F., Ros Barceló, A., Roig, M.G., Shnyrov, V.L., van Huystee, R.B., Kurochkin, I.N., Vorobiev, A.K. & Sakharov, I.Y. Synthesis of conducting polyelectrolyte complex of polyaniline and poly(2-acrylamide-3methyl-1-propane-sulfonic acid) catalyzed by pH-stable palm peroxidase, *Biomacromolecules* 6 (2005) 1360-1306.

Caramyshev, A.V., Firsova, Y.N., Slastya, E.A., Tagaev, A.A., Potapenko, N.V., Lobatova, E.S., Pletjushkina, O.Y., & Sakharov, I.Y. Purification and characterization of windmill palm tree (*Trachycarpus fortunei*) peroxidase. *J. Agrc. Food Chem.* 54 (2006) 9888-9894.

Caramyshev, A.V., Lobachev, V.M., Selivanov, D.V., Sheval, E.V., Vorobiev, A.K., Katasova, O.N., Polyakov, V.Y., Makarov, A.A. & Sakharov, I.Y. Micellar

peroxidase- catalyzed synthesis of chiral polyaniline. *Biomacromolecules* 8 (2007) 2549-2555.

Chang, H.C., Holland, R.D., Bumpus, J.A., Churchwell, M.I. and Doerge, D.R. inactivation of *Coprinus cinereus* peroxidase by 4-chloroaniline during turnover: comparison with horseradish peroxidase and bovine lactoperoxidase. *Chem. Biol. Interact.* 123 (1999) 197-217.

Chevion, M., Berenshtein, E. & Stadtman, E.R. Human studies related to protein oxidation: Protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic. Res.* 33 (2000) S99-S108.

Chivukula, M., Spadaro, J.T., Rengathan, V. Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides, *Biochemistry* 34 (23) (1995) 7768-7772.

Cleland, W.W. The enzymes, 3<sup>rd</sup> ed., Boyer, P.D., ed Academic, New York, Vol. II (1970) 1-65

Colonna, S., Gaggero, N., Richelmi, C., & Pasta, P., Recent biotechnological developments in the use of peroxidase, Elsevier Science 17 (1999) 163-168.

Cullen, D. & Kersten, P.J., Enzymology and molecular biology of lignin degradation, in: R. Braml, G.A. Mazzluf (Eds.), The Micota III – Biochemistry and Molecular Biology – Verlag, Berlin-Heidelberg (2004) 249-273.

Dean, R.T., Fu, S.L., Stocker, R. & Davies, M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 324 (1997) 1-18.

DePaz, R.A., Barnett, C.C., Dale, D.A., Carpenter, J.F., Gaertner, A.L. & Randolph, T.W. The excluding effects of sucrose on a protein chemical degradation pathway: methionine oxidation in subtilisin. *Arch. Biochem. Biophys.* 384 (2000) 12-132.

Dordick, J.S., Klivanov, A.M. & Marletta, M.A. Horseradish peroxidase catalyzed hydroxylations: mechanistic studies. *Biochemistry* 25 (1986) 2946-2951.

Dordick, J.S., Marletta, M.A. & Klivanov, A.M., Polymerization of Phenols Catalyzed by Peroxidase in Non-Aqueous Media. *Biotechnol. Bioeng.* 30 (1987) 31-36.

Duarte-Vázquez, M.A., Ortega-Tovar, M.A., García-Almendárez, B.E., Regalado, C.J. Removal of aqueous phenolic compounds from model system by oxidative polymerization with turnip (*Brassica napus* L. var purple top White globe) peroxidase. *Chem. Technol. Biotechnol.* 78(1) (2003) 42-47.

Dubey, A., Diwakar, S. K., Rawat, S. K., Kumar, P., Batra, N., Joshi, A. & Singh, J. Characterization of ionically bound peroxidases from apple (*Mallus pumilus*) fruits. *Prep Biochem Biotechnol* 37 (2007) 47-58.

Dunford, H.B. Peroxidases in Chemistry and Biology, edited by J. Everse, K.E. Everse & M.B. Grisam, Vol. II. Boca raton, FL, USA: CRC Press (1991) 1-24.

Dunford, H.B. Heme peroxidases, Wiley-VCH, Nueva York, USA (1999). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 486-501.

Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66 (2010) 486-501.

Everett, R.R., Soedjak, H.S. & Butler, A. Mechanism of dioxygen formation catalyzed by vanadium bromoperoxidase. *J. Biol. Chem.* 265(26) (1996) 15671-15679

Fairbanks, G., Steck, T.L. & Wallach, D.F. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10 (1971) 2606-2617.

Feng, J.Y., Liu, J.Z. & Ji, L.N. Thermostability, solvent tolerance, catalytic activity and conformation of cofactor modified horseradish peroxidase. *Biochimie*. 90 (2008) 1337-1346.

Freire, E., Statistical thermodynamic analysis of the heat capacity function associated with protein folding-unfolding transitions. *Comm. Mol. Cell. Biophys.* 6 (1989) 123-140.

Gadjhede, M. Plant peroxidases: substrate complex with mechanistic implications. *Biochem. Soc. Trans.* 29 (2001) 91-98.

Gadjhede, M., Schuller, D., Henriksen, A., Smith, A.T. & Poulos, T.L. crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution, *Nature Struct. Biol.* 4 (1997) 1032-1038.

Gazaryan, I.G., Reshetnikova, I.A., Doseeva, V.V. & Bekker, E.G. Isolation and comparative analysis of peroxidases from the fungus *Phellinus igniarius* (L. Fr) Quel. 90-1 and tobacco. *Biochemistry (Moscow)* 60 (1995) 767-771.

Gold, M.H, Kuwahara, M. Chiu, A.A. & Glenn, J.K. Purification and characterization of an extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring diethylpropane oxygenase from the white rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem. Biophys.* 234 (1984) 353-362.

Guimaraes, B. G., Sanfelici, L., Neuenschwander, R. T., Rodrigues, F., Grizolli, W. C., Raulik, M. A., Piton, J. R., Meyer, B. C., Nascimento, A. S. & Polikarpov, I. *The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS. J Synchrotron Radiat* 16 (2009) 69-75.

Henriksen, A., Mirza, O., Indiai, C., Teilum, K., Smulevich, G., Welinder, K.G. & Gadjhede, M. Structure of soybean seed coat peroxidase: a plant

peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. *Protein Sci.* 10 (2001)108-115

Henriksen, A., Welinder, K.G. & Gajhede, M. Structure of barley grain peroxidase refined at 1.9 Å resolution. A plant peroxidase reversibly inactivated at neutral pH. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 2241-2248.

Hidalgo Cuadrado, N., Arellano, J.B., Calvete, J.J., Sanz, L., Zhadan, G.G., Polikarpov, I., Bursakov, S., Roig, M.G., Shnyrov, V.L. Substrate specificity of the *Chamaerops excelsa* palm tree peroxidase. A steady-state kinetic study. *J. Mol. Cat. B: Enzy.* (2011a) (In press)

Hidalgo Cuadrado, N., Zhadan, G.G., Roig, M.G., Shnyrov, V.L. Suicide inactivation of peroxidase from *Chamaerops excelsa* palm tree leaves. *Int. J. Biol. Macromol.* (2011b) (In press)

Hidalgo Cuadrado, N., Arellano, J.B., Calvete, J.J., Sanz, L., Zhadan, G.G., Textor, L.C., Polikarpov, I., Bursakov, S., Roig, M.G., Shnyrov, V.L. Palm Peroxidases: The most robust enzymes. *Curr. Top. Biochem. Res.* (2011c) (In press)

Hill, B.C., Horowitz, P.M. & Robinson, .C. Detection, characterization, and quenching of the intrinsic fluorescence of bovine heart cytochrome c oxidase. *Biochemistry* 25 (1986) 2287-2292.

Hiner, A.N.P., Hernandez-Ruiz, J., Garcia Canovas, F., Smith, A.T., Arnao, M.B. & Acosta, M. A comparative study of the inactivation of wild-type, recombinant and two mutant horseradish peroxidase isoenzymes C by hydrogen peroxide and m-chloroperoxybenzoic acid. *Eur. J. Biochem.* 237 (1995) 506-512.

Hiner, A.N.P., Martinez, J.I., Arnao, M.B., Acosta, M., Turner, D.D., Raven, E.L. & Rodriguez-Lopez, J.N. Detection of a tryptophan radical in the reaction of ascorbate peroxidase with hydrogen peroxide. *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 3091-3098.

Hiner, A.N:P., Rodriguez-Lopez, J.N., Arnao, M.B., Lloyd Raven, E., Garcia-Cánovas, F. & Acosta, M.A. Kinetic study of the inactivation of ascorbate peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 348 (2000) 321-328.

Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y. & Matsui, H. A large family of Class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* 42 (2001) 462-468.

Kabsch, W. Integration, scaling, space-group assignment and post refinement.. *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 133-144.

Kedderis, G.L. & Hollenberg, P-F. Steady State Kinetics of chloroperoxidase-catalyzed N-demethylation reactions. *J. Biol. Chem.* 258-20 (1983) 12413-12419.

Kurganov, B.I., Lyubarev, A.E., Sánchez-Ruiz, J.M., Shnyrov, V.L., Analysis of differential scanning calorimetry data for proteins Criteria of validity of one-step mechanism of irreversible protei denaturation. *Biophys. Chem.* 69 (1997) 125-135.

Kuwahara, M., Glenn, J.K., morgan, M.A. & Gold, M.H. Separation and characterization of teo extracellular H2O2-dependent oxidases from ligninolyt cultures of *Phanerochaet chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169 (1984) 247-250.

Lindgren, A., Ruzgas, T., Gorton, L., Csöregi, E., Bautista Ardila, G., Skharov, I.Y., Gazaryan, I.G. Biosensors based on novel peroxidases with improved properties in direct and mediated electron transfer. *Biosens. Bioelectron.* 15(9-10) (2000) 491-497.

Liu, J.L., Lu, K.V., Katta, V., Westcott, K.R., Narhi, L.O. & Lu, H.S. In vitro methionine oxidation of recombinant human letin. *Pharm. Res.* 15 (1998) 632-640.

Liu, W., Kumar, J., Tripathy, S., Senecal, K.J. & Samuelson, L. Enzymatically synthesized conducting polyaniline, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 71-78.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.

Lumry, R. & Eyring, H. Conformational changes of proteins. *J. Phys. Chem.* 58 (1954) 110-120.

Lyubarev, A.E. & Kurganov, B.I. modeling of irreversible thermal protein denaturation at varying temperature. I. The model involving two consecutive irreversible steps. *Biochemistry (Moscow)* 63 (1998) 434-440.

Lyubarev, A.E. & Kurganov, B.I. modeling of irreversible thermal protein denaturation at varying temperature. II. The complete kinetic model of Lumry and Eyring. *Biochemistry (Moscow)* 64 (1999) 832-838.

MacDiarmid, Alan. G. Polyaniline and polypyrrole: where are we headed? *Synth. Met.* 84 (1997) 27-34.

Manly, S.P., Matthews, K.S. & Sturtevant, J.M. Thermal denaturation of the core protein of lac repressor. *Biochemistry* 24 (1985) 3842-3846.

Matthews, B.W. solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* 33 (1968) 491-497.

McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J. *J Appl Crystallogr* 40 (2007). 658-674.

Milzani, a., Rossi, R., Di Simplicio, P., Giustarii, D., Colombo, R. & dalleDonne, I. The oxidation produced by hydrogen peroxide on Ca-ATP-G-actin. *Protein Sci.* 9 (2000) 1774-1782.

Morales, M. & Ros Barceló, A. A basic peroxidase isoenzyme from vacuoles and cell walls of *Vitis vinífera*. *Phytochem.* 42(2) (19997) 229-232



Nagano, s., Tanaka, M., Ishimori, K., Watanabe, Y. & Morishima, I. Catalytic roles of the distal site asparagine-histidine couple in peroxidases. *Biochemistry* 35 (1996) 14251-14258.

Nakajima, R. & Yamakazi, I. The conversion of horseradish peroxidase c to a verdohemoprotein by a hydroperoxide derived enzymatically from indole-3-acetic acid and by m-nitroperoxybenzoic acid. *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 2067-2071.

O'Carra, P. Heme-cleavage: biological systems and chemical analogs. In *Porphyrin and Metalloporphyrins*, K. Smith, ed. (Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Scientific Publishing), 123-153 (1975)

Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., Dunard, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* 24 (2005) 255-265.

Patterson, W.R., Poulos, T.L. & Goodin, D.B. Identification of a porphyrin  $\pi$ -cation radical in ascorbate peroxidase compound I. *biochemistry* 34(13) (1995) 4342-4345.

Penel, C., Gaspar, T. & Greppin, H. *Plant Peroxidases 1980-90. Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects.* University of Geneva, Switzerland, 1992.

Permyakov, E.A. *Luminescent Spectroscopy of Proteins.* CRC Press, Boca Raton 1993.

Picot, D., Loll, P.J. & Garavito, M. the X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H<sub>2</sub> synthase-1. *Nature* 367 (1994) 243-249.

Pina, D.G., Shnyrova, A.V., Gavilanes, F., Rodríguez, A., Leal, F., Roig, M.G., Sakharov, I.Y., Zhadan, G.G., Villar, E. & Shnyrov, V.L. thermally induced conformational changes in horseradish peroxidase. *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 120-126.

Piontek, K., Smith, A.T. & Blodig, W. Lignin peroxidase structure and function. *Biochem. Soc. Trans.* 29 (2001) 111-116.

Poulos, T.L. & Kraut, J. The stereochemistry of peroxidase catalysis. *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 8199-8205.

Privalov, P.L. Stability of proteins. Small globular proteins. *Adv. Protein Chem.* 33 (1979) 167-241.

Privalov, P.L. Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system. *Adv. Protein Chem.* 35 (1982) 1-104.

Privalov, P.L. Thermodynamic problems of structure. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 18 (1989) 47-69.

Privalov, P.L. & Potekhin, S.A. Scanning microcalorimetry in studying temperature induced changes in proteins. *Methods Enzymol.* 131 (1986) 4-51.

Provencher, S.W. & Glockner, J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20 (1981) 33-37.

Raha, S. & Robinson, B.H. mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem. Sci* 25 (2000) 502-508.

Ramakrishna, N., Lacey, J., Candish, A.A., Smith, J.E. & Goodbrand, I.A. Monoclonal antibody-based enzyme linked immunosorbent assay aflatoxin B1, T-2 toxin, and ochratoxin A in barley. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73(1) (1990) 71-76.

Rasmussen, C.B., Henriksen, A., Abelskov, A.K., Jemsem, R.B., Rasmussen, S.K., Hejgaard, J. & Welinder, K.G. Purification, characterization and stability of barley grain peroxidase BP1, a new type of plant peroxidase. *Physiol. Plant.* 100 (1997) 102-110.

Regalado, C., García-Almendarez, B.E., & Duarte-Vázquez, M.A. Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem. Rev.* 3 (2004) 243-256.

Rodríguez, A., Pina, D.G.; Yélamos, B., Castillo-León, J.J., Zhadan, G.G.; villar, E., Gavilanes, F., Roig, M.G., Sakharov, I.Y. & Shnyrov, V.L. Thermal stability of peroxidase from African oil palm tree *Elaeis guineensis*. *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 2584-2590.

Rodríguez-Lopez, J.N., Espín, J.C., del Amor, F., Tudela, J., Martínez, V., Cerdá, A. & García-Cánovas, F. Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from melón (*Cucumis melo L.*) cultivates under different salinity conditios. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 1537-1541.

Rodríguez-López, J.N., Lowe, D.J., Hernández Ruiz, J., Hiner, A.N.P., García-Cánovas, F. & Thorneley, R.N.F. Mechanism of reaction of hydrogen peroxide with horseradish peroxidase: identification of intermediates in the catalytic cycle. *J. Am. Chem. Soc.* 123(48) (2001) 11838-11847.

Ruan, H., Tang, X.D., Chen, M.-L., Joiner, M.A., Sun, G., Brot, N., Weissbach, H., Heinemann, S.H., Iverson, L., Wu, C.F. & Hoshi, T. High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 2748-2753.

Ruzgas, T. Csöregi, E., Katakis, I., Kenausis, G. & Gorton, L. Preliminary investigations of an amperometric ologosaccharide dehydrogease-based electrode for the detection of glucose and some other low molecular weight saccharides. *J. Mol. Recognit.* 9(5-6) (1996a) 480-484.

Ruzgas, T. Csöregi, E., Emnéus, J., Gorton, L. & Marlo-Varga, G. Peroxidase-modified electrodes: fundamentals and application. *Anal. Chem. Acta.* 330 (1996b) 123-168.

Ryan, B.J., O'Connell, M.J. & O'Fàgáin, C. consensus mutagenesis reveals that non-helical regions influence thermal stability of horseradish peroxidase. *Biochimie* 90 (2008) 1389-1396.

Sakharov, I.Y. Palm tree peroxidases. *Biochemistry (Moscow)* 69 (2003) 823-829.

Sakharov, I.Y. & Sakharova, I.V. Extremely high stability of African oil palm tree peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1598 (2002) 108-114.

Sakharov, I.Y., Vesga, M.K., Galaev, I.Y., Sakharova, I.V. & Pletjushkina, O.Y. Peroxidase from leaves of reoyal palm tree *Roystonea regia*: purification and some properties. *Plant. Sci.* 161 (2001) 853-860.

Sakharov, I.Y., Vesga, M.K & Sakharova, I.V. Substrate specificity of African oil palm tree peroxidase, *Biochemistry (Moscow)* 67 (2002) 1043-1047.

Sánchez-Ruiz, J.M. Differential scanning calorimetry of proteins. *Sub. Biochem.* 24 (1995) 133-176.

Sánchez-Ruiz, J.M., López-Lacomba, J.L., cortijo, M. & Mateo, P.L. Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. *Biochemsitry* 27 (1988) 1648-1652.

Schuller, D.J., Ban, N., van Huystee, R.B., McPherson, A. & Poulos, T. the crystal structure of peanut peroxidase. *Structure* 4 (1996) 311-321.

Shnyrov, V.L., Sánchez-Ruiz, J.M., Boiko, B.N., Zhadan, G.G., Permyakov, A. Applications of Scanning microcalorimetry in biophysics and biochemistry. *Termochim. Acta* 302 (1997) 165-180

Smith, A.T. & Veitch, N.C. Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2(2) (1996) 269-278.

Sreerama, N., Venyaminov, S.Y. & Woody, R.W. Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci.* 8 (1999) 370-380.

Sreerama, N. & Woody, R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* 287 (2000) 252-260.

Sturtevant, J. M. Biochemical applications of differential scanning calorimetry. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 38 (1987) 463-488.

Taggart, C., Cervantes-Laurean, D., Kim, G., McElvaney, N.G., Wehr, N., Moss, J. and Levine, R.L. Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha(1)-antitrypsin causes loss of anti-nutrophil elastase activity. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 27258-27265.

Tams, J.W. & Welinder, K.G. Unfolding and refolding of *Coprinus cinereus* peroxidase at high pH, in urea and at high temperature. Effect of organic and ionic additives on these process. *Biochemistry* 35 (1996) 7573-7579.

Tamura, A., Kinura, K., Takahara, H. & Akasaka, K. Cold denaturation and heat denaturation of Streptomyces subtilisin inhibitor: (I). CD and DSC studies. *Biochemistry* 30 (1991) 11307-11313.

Textor, L.C., Santos, J.C., Hidalgo Cuadrado, N., Roig, M.G., Zhadan, G.G., Shnyrov, V.L. & Polikarpov, I. Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of Chamaerops excels palm tree peroxidase. *Acta Crystallogr. F* (2011) (In press).

Thompson, Q.R. Peroxidase-based colorimetric determination of L-ascorbic acid. *Anal. Chem.* 59 (1987) 1119-1121.

Thompson, K.S., Vinson, C.R. & Freire, E. Thermodynamic characterization of the structural stability of the coiled-coil region of the bZIP transcription factor GCN4. *Biochemistry* 32 (1993) 5491-5496.

Tien, M. & Kik, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 2280-2284.

Timofeevski, S.L., Reading, N.S & Aust, S.D. Mechanisms for protection against inactivation of manganese peroxidase by hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 356 (1998) 287-295.

Tsong, T.Y. The Trp-59 fluorescence of ferricytochrome c as a sensitive measure of the over-all protein conformation. *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 1988-1990.

Vagin, A.A., Steiner, R.A., Lebedev, A.A., Ptterton, L., McNicholas, S., Long, F. & Murshudov, G.N. REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr. D. Biol Crystallogr.* 60 (2004) 2184-2195.

Van Huystee, R.B. Roig, M.G., Shyro, V.L. & Sakharov, I.Y. Peroxidase stability related to its calcium and glycans. *Phytochem. Rev.* 3 (2004) 19-28.

Veitch, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochem. Rev.* 65 (2004) 259-269.

Veitch, N.C. Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochem. Rev.* 3 (2004) 3-18.

Venyaminov, S.Y. & Vassilenko, K.S. Determination of protein tertiary structure class from dichroism circular. *Anal. Biochem.* 222(1) (1994) 176-184.

Wariishi, H., Akileswaran, L. & Gold, M.H. Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. *Biochemistry* 27 (1988) 5365-5370.

Wariishi, H. & Gold, M.H. Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 2070-2077.

Watanabe, L., de Moura, P.R., Bleicher, L., Nasimiento, A.S., Zamorano, L.S., Calvete, J.J., Sanz, L., Pérez, A., Bursakov, S., Roig, M.G., Shnyrov, V.L. & Polikarpov, I. Crystal structure and statistical coupling analysis of highly glycosylated peroxidase from royal palm tree (*Roystonea regia*). *J. Struct. Biol.* 169 (2010) 226-242.

Watanabe, L., Nasimiento, A.S., Zamorano, L.S., Shnyrov, V.L. & Polikarpov, I. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of royal palm tree (*Roystonea regia*) peroxidase. *Acta Cryst. F63* (2007) 780-783.

Welinder, K.G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2 (1992) 388-393.

Welinder, K.G. & Gajhede, M. Structure and evolution of peroxidases. *Plant Peroxidases Biochemistry and Physiology*. University of Copenhagen y University of Génova, Génova, Swiss (1993) 35-42.

Welider, K.G. Plant peroxidases. Their primary, secondary and tertiary structures and relation to cytochrome c peroxidase. *Eur. J. Biochem.* 151 (1985) 497-504.

Ximenes, V.F., Catalani, L.H. & Campa, A. oxidation of metalotonin and tryptophan by and HRP cycle involvig Compound III. *Biochem. Biophys. Res Comm.* 287 (2001) 130-134.

Yonetani, K. & Schleyer, H. Studies on cytochrome c peroxidase. VII. Electron paramagnetic resonance absorptions of the enzyme and complex ES in dissolved and crystalline forms. *J. Biol Chem.* 241 (1996) 3240-3243.

Zamorano, L.S., Pina, D.G., Gavilanes, F., Roig, M.G., Sakharov, I.Y., Jadan, A.P., van Huystee, R.B., Villar, E. & Shnyrov, V.L. Two-state irreversible thermal denaturation of anionic peanut (*Arachis hypogaea L.*) peroxidase. *Thermochim. Acta.* 417 (2004) 67-73.

Zamorano, L.S., Roig, M.G., Villar, E. & Shnyrov, V.L. The versatile peroxidases. *Curr. Top. Biochem. Res.* 9 (2007) 1-26.

Zamorano, L.S., Pina, D.G., Arellano, J.B., Bursakov, S.A., Zhadan, A.P., Calvete J.J., Sanz, L., Nielsen, P.R., Villar, E., Gavel, O., Roig, M.G., Watanabe, L., polikarpov, I. & Shnyrov, V.L. Thermodynamic characterization of the palm tree *Roystonea Regia* peroxidase stability. *Biochimie* 90 (2008) 1737-1749.

Zamorano, L.S., Barrera Vilarmau, S., Arellano, J.B., Zhadan, G.G., hidalgo Cuadrado, N., Bursakov, S.A., Roig, M.G., & Shnyrov, V.L. Thermal stability from *Chamaerops excelsa* palm tree at pH 3.0. *Inter. J. Biol. Macromol.* 44 (2009) 326-332.

Zheng, J. & Fenna, R.E. X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 226 (1992) 185-207.

Zheng, X & Van Huystee, R.B. anionic peroxidase catalysed ascorbic acid ad IAA oxidation in the presence oh hydrogen peroxide: A defence system against peroxidative stress in peanut plant. *Phytochem* 31 (1992) 0895-1898.





## **APENDICE**



## APÉNDICE

**Nomenclatura de los aminoácidos esenciales con las abreviaturas de tres y una letra (Alberts, 1994).**

<b>Aminoácidos y su nomenclatura</b>			<b>Tipo</b>
<b>A</b>	Ala	Alanina	No polar
<b>C</b>	Cys	Cisteína	No polar
<b>D</b>	Asp	Ácido aspártico	Ácido
<b>E</b>	Glu	Ácido glutámico	Ácido
<b>F</b>	Phe	Fenilalanina	No polar
<b>G</b>	Gly	Glicina	No polar
<b>H</b>	His	Histidina	Básico
<b>I</b>	Ile	Isoleucina	No polar
<b>K</b>	Lys	Lisina	Básico
<b>L</b>	Leu	Leucina	No polar
<b>M</b>	Met	Metionina	No polar
<b>N</b>	Asn	Asparagina	Polar
<b>P</b>	Pro	Prolina	No polar
<b>Q</b>	Gln	Glutamina	Polar
<b>R</b>	Arg	Arginina	Básico
<b>S</b>	Ser	Serina	Polar
<b>T</b>	Thr	Treonina	Polar
<b>V</b>	Val	Valina	Polar
<b>W</b>	Trp	Triptófano	No polar
<b>Y</b>	Tyr	Tirosina	Polar



VNIVERSITAS  
STVDII  
SALAMANTINI

